

**Histochemische und morphologische
Beobachtungen bei der Alterung
von Hela-Zellen**

Matthias Hollmann

1964

Aus dem Senckenbergischen Pathologischen Institut
der Universität Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. W. Rotter

Histochemische und morphologische
Beobachtungen bei der Alterung
von Hela-Zellen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Matthias Hollmann
aus Wiesbaden

Frankfurt am Main 1964



Dekan: Prof. Dr. med. J. Frey

Referent: Prof. Dr. med. H. Zimmermann

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. A. Wacker

Mündliche Prüfung: 3. 12. 1964

Herrn Professor Dr.med.H.Zimmermann,Prosektor des Pathologischen Institutes der Universität Frankfurt am Main,danke ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für die Anregungen und Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Dem Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Frankfurt am Main,Herrn Professor Dr.med.K.Herzberg,und Herrn Privat-Dozent Dr.med.G.May danke ich ergebenst für die großzügige Überlassung der Hela-Zellkulturen und für wertvollen Rat.

Die Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt,wofür ich gleichfalls meinen Dank sage.

Histochemische und morphologische Beobachtungen bei der Alterung von Hela-Zellen

- A. Einleitung
- B. Methodik
 - I. Züchtung der Zellen
 - II. Präparation der Zellen
 - III. Fixation
 - IV. Histochemische Methoden
 - 1.) Alkalische Phosphatase(aPh)
 - 2.) Saure Phosphatase(sPh)
 - 3.) Aminopeptidase(AP)
 - 4.) Succinodehydrogenase(SD)
 - 5.) Isocitricodehydrogenase(ID)
 - 6.) Scharlachrot(SR)
 - 7.) Sudan Schwarz B(SB)
 - 8.) PAS-Reaktion(PAS)
 - 9.) Hämatoxylin/Eosin(HE)
 - V. Auswertungsmethoden
- C. Beschreibung der Ergebnisse eigener Untersuchungen
 - 1.) }
bis } wie unter B/IV:
8.) } Histochemische Methoden
9.) Morphologie
 - Zusammenfassung der Befunde
- D. Diskussion der Befunde
- E. Zusammenfassung
- F. Abbildungen
 - I. Graphische Darstellungen:Abb.1-7
 - II. Photographische Abbildungen:Abb.8-10
- G. Literaturverzeichnis

A. Einleitung

Seitdem es im Jahre 1952 GEY, COFFMAN u. CUBICEK gelungen war, Zellen eines menschlichen Epidermoidcarcinoms der Cervix uteri in vitro weiterzuzüchten, sind diese unter der Bezeichnung H e l a - Zellen von zahlreichen Autoren nach vielen Richtungen, u.a. auch histochemisch untersucht worden.

Die Ergebnisse histochemischer Untersuchungen an stationären, auf Glasoberflächen wachsenden Hela-Zellen (Deckglaskulturen) stimmen jedoch nicht immer überein. So fanden FORTELIUS, LEVONEN u. SAXEN sowie KAUFMAN u. HILL eine positive, SANDRITTER u. SCHIEMER dagegen eine negative Succinodehydrogenase-Reaktion. Scharlach-rotpositive Substanzen vermiste ZWIETZ, wogegen FORTELIUS Neutralfette nachweisen konnte. BIMES, PLANEL u. DAVID beobachteten Glykogen, Van DUIJN sowie ZWIETZ fanden keines.

Solche unterschiedlichen Resultate konnten auf der Verwendung verschiedener, durch Modifikationen bzw. Mutationen entstandener Unterstämme der ursprünglichen Hela-Stammzelle beruhen. So beschrieben FORTELIUS, SAKSELA u. SAXEN einen Stamm mit fehlender Aktivität der alkalischen Phosphatase, der aus einer negativen Zelle eines sonst positiven Stammes hervorgegangen war. GROPP beschrieb milieubedingte Veränderungen dieses Ferments.

Wir vermuteten, daß bei den unterschiedlichen Ergebnissen auch Alterungs- und Degenerationerscheinungen der Zellen im Spiele sein könnten, besonders auch solche, die durch Verbrauch des Nährmediums verursacht werden. In den Arbeiten, die sich mit der Histochemie der Hela-Zelle befassen (BIMES et al.; FORTELIUS et al.; GREEN u. VERNEY; GROPP; SANDRITTER u. SCHIEMER; ZWIETZ), fanden wir nur sehr unvollständige oder gar keine Angaben über das Alter der untersuchten Zellen und über die Konzentration der Zellen in der Nährlösung. Lediglich BIMES et al. sowie FORTELIUS geben genauere Daten an. Diese Autoren führten ähnliche Untersuchungen wie die nachfolgend vorgelegten aus.

Wir gestalteten die Wachstumsbedingungen stationärer Zellen zunächst so, daß sich Degenerationerscheinungen einstellen mußten (hohe Zelldichte, kein Austausch des Nährmediums), studierten diese eingehend und verglichen die Beobachtungen mit solchen unter günstigeren Wachstumsbedingungen (geringere Zelldichte).

Außer den auf Oberflächen wachsenden stationären Zellen untersuchten wir Hela-Zellen, die frei schwimmend als Zellsuspension

gezüchtet wurden, und deren Wachstumsbedingungen durch ständige Erneuerung des Nährmediums optimal gehalten wurden. Wir wollten durch diesen Vergleich auch feststellen, ob der unterschiedlichen Wachstumsart (frei schwimmend oder stationär auf Oberflächen) grundsätzliche Unterschiede der Ferment- und Stoffwechselaktivität entsprechen.

B. Methodik

I. Züchtung der Zellen

Die Hela-Zellen erhielten wir aus dem Hygiene-Institut der Universität Frankfurt am Main, und zwar als Suspensionszellen und als auf Glasoberflächen gewachsene stationäre Zellen. Die *Suspensionszellen* werden dort in großen Kulturgefäßen gezüchtet und durch ein Rührwerk in ständiger Bewegung gehalten. Das Nährmedium wird durch laufende Entnahme und entsprechende Zufügung von frischem Medium ständig erneuert. Die Methode ist von MAY (1962) beschrieben. Die auf Glasoberflächen wachsenden *stationären Zellen* werden in der üblichen Weise in Rous-Schalen gezüchtet. Als Nährmedium wird das von MAY (1959) angegebene verwendet. Dieses Nährmedium wurde uns zur Weiterzüchtung der Zellen ebenfalls vom Hygiene-Institut zur Verfügung gestellt.

II. Präparation der Zellen

Zur Untersuchung der *Suspensionszellen* wurden 100 ml der Zellsuspension aus den Kulturgefäßen entnommen und bei maximal 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Nährmedium wurde vom Zellsediment abgegossen und das letztere nach vorsichtiger Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung mit 0,2%iger Trypsinlösung von pH 7,6 15 Minuten lang pipettiert. Nach abermaliger Zentrifugierung wurden die Trypsinlösung abgekippt und das Sediment nach kurzer Waschung mit einigen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Zur Durchführung der Fermentreaktionen gaben wir einige Tropfen dieser konzentrierten Suspension in die Inkubationslösung. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Inkubationslösung durch ein Filterpapier abgesaugt, und anschließend wurde physiologische Kochsalzlösung durchgezogen. Dann fixierten wir die auf dem Filter

liegenden Zellen mit Formalin und tupften sie nach nochmaligem Spülen vom Filterpapier auf einen Objektträger ab. Dort wurden sie mit einem Tropfen Glyzeringelatine eingedeckt. Bei der PAS-, Hämatoxylin/Eosin-, Sudanschwarz- und Scharlachrot-Färbung wurden einige Tropfen der konzentrierten Suspension direkt auf ein im Trichter liegendes Filterpapier gebracht. Die Färbelösungen wurden in gewünschter Dauer durch Verstopfen des Trichterlaufs auf dem Filter gehalten und dann abgesaugt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen - wie oben beschrieben - abgetupft und eingedeckt.

Alle Färbungen wurden möglichst bald nach der Entnahme der Zellen durchgeführt. Dreimal hoben wir die konzentrierte Suspension jedoch bei 4°C bis spätestens zum 9. Tag auf und untersuchten sie in 1-2tägigen Abständen.

Zur Herstellung der Deckglaskulturen gingen wir von stationären Zellen des Hygiene-Instituts aus, die durch Trypsinierung von der Glasoberfläche abgelöst, zentrifugiert und in Nährlösung aufgeschwemmt wurden. Diese Aufschwemmung stellten wir in verschieden hoher Zellkonzentration her, und zwar in

niedriger Konzentration (Zelldichte)		50 000 Zellen pro ml		
mittelhoher	"	"	150 000	" "
hoher	"	"	200 000	" "
sehr hoher	"	"	über 200 000	" "

Wir brachten diese Aufschwemmung anschließend in Petrischalen, auf deren Boden jeweils 4 Deckgläschen mit Eiweißlösung festgeklebt waren. Die Petrischalen wurden mit Leukoplast oder Tesafilm zugeklebt und bei 37°C gehalten. Während des Wachstums der Zellen blieben sie geschlossen, das Nährmedium wurde nicht erneuert. Alle 1-2 Tage wurden 1-2 Schalen geöffnet und die auf den Deckgläschen angewachsenen Zellen untersucht. Die längste Wachstumszeit nach der Auspflanzung betrug 10 Tage.

Die Präparation der Deckglaskulturen erfolgte bis zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Beachtung der nötigen Vorsichtsmaßnahmen zur Verhütung bakterieller und anderer Verunreinigungen.

III. Fixation

Die Zellen wurden insgesamt 20 Minuten in kaltem 6%igem Formalin

mit 0,8% NaCl fixiert. Bei der Succino- und der Isocitricodehydrogenase-Reaktion wurde nur nach der Fermentreaktion, bei alkalischer und saurer Phosphatase und Aminopeptidase vor und nach der Reaktion jeweils 10 Minuten lang und bei den übrigen Färbungen nur vorher fixiert.

IV. Histochemische Methoden

1.) Alkalische Phosphatase(aPh) (Diazonium-Methode nach PEARSE, modifiziert nach H.KREY): Die Zellen wurden unter Lichtabschluß bei Zimmertemperatur 30 Minuten in folgendem Medium inkubiert:

Variaminblausalz	1 Teil(in mg)
Napththol-AS-TR-Phosphat	1 Teil(in mg)
Trispuffer pH 10	1 Teil(in ml)
Filtrieren	

Als Kontrollen wurden Hemmversuche mit Alloxan(10 und 20 mg pro ml) und Leerversuche ohne Substrat durchgeführt.

2.) Saure Phosphatase(sPh) (Diazonium-Methode nach PEARSE, modifiziert nach H.KREY): Inkubation unter Lichtabschluß bei Zimmertemperatur für 90 Minuten in folgendem Medium:

Fast Garnet GBC-Salz	1 Teil(in mg)
Napththol-AS-TR-Phosphat	1 Teil(in mg)
Azetatpuffer 0,2 M, pH 5	1 Teil(in ml)
Filtrieren	

Als Kontrollreaktion Leerversuche ohne Substrat.

Die Phosphatasen spalten aus dem substituierten Napththol-Phosphorsäureester die Phosphorsäure von der OH-Gruppe hydrolytisch ab; das Napththol kuppelt mit den Diazoniumsalzen Variaminblausalz zu einem blauen und Fast Garnet GBC-Salz zu einem roten Azofarbstoff. Das Substrat Napththol-AS-TR-Phosphat zeichnet sich gegenüber anderen Phosphatasesubstraten dadurch vor allem aus, daß die entsprechenden Azofarbstoffe sehr wenig wasserlöslich sind und deshalb nur eine geringe Diffusionsneigung besitzen. Dadurch ist eine sehr gute Lokalisation der Fermentaktivität möglich. Die verwendeten Diazoniumsalze haben bei der angewandten Konzentration nur eine geringe hemmende Wirkung auf das Ferment (PEARSE).

3.) Aminopeptidase(AP) (sogenannte "Leucinaminopeptidase") (Diazonium-Methode nach BURSTONE u. FOLK): Inkubation unter Lichtab-

schluß bei Zimmertemperatur für 2 1/4 Stunden in folgendem Medium:

Fast Garnet GBC-Salz	30 mg
L-Leucyl- β -naphthylamid 1%	1 ml
Trispuffer pH 7,2	10 ml
Aqua dest.	40 ml
Filtrieren	

Kontrollreaktionen wurden als Leerversuche ohne Substrat durchgeführt.

Durch das Ferment wird die Peptidbindung zwischen Leucin und β -Naphthylamin hydrolytisch gelöst. Das β -Naphthylamin kuppelt mit dem Fast Garnet GBC-Salz zu einem orange-bis rotbraunen Azofarbstoff.

4.) Succinodehydrogenase (SD) (Methode von NACHLAS, TSOU et al., modifiziert nach FORTELIUS): Die Zellen wurden in folgender Lösung 3 Stunden bei 37°C inkubiert:

Nitro-BT 1 mg pro 1 ml Aqua dest.	2 Teile
Succinat 0,2 m	1 Teil
Phosphatpuffer 0,2 m, pH 7,6 (nach Sørensen) mit 2 g KCN pro Liter	1 Teil
MgCl ₂ 0,05 m	0,04 Teile

Als Kontrollen wurden Hemmversuche mit Malonat (3,3/5/10 mg pro ml), einem spezifischem Hemmstoff der Succinodehydrogenase, und Leerversuche ohne Succinat durchgeführt.

5.) Isocitricodehydrogenase (ID) (modifizierte Methode nach ZIMMERMANN u. PLATT): Die Zellen wurden ebenfalls 3 Stunden bei 37°C in folgender Lösung inkubiert:

Nitro-BT 1 mg pro ml Aqua dest.	1 Teil
Isocitrat 0,04 m	1 Teil
NaCN 0,1 m	1 Teil
Mit n-HCl auf pH 7,2 titrieren	
Trispuffer pH 7,2	ad 4 Teile
26 mg DPN pro 10 ml der Lösung (ergibt eine Endkonzentration von 4×10^{-3} m)	

1 Tropfen 0,05 m MgCl₂ pro 10 ml der Lösung.

Als Kontrollen wurden Hemmversuche mit Adenosin-2'-monophosphat (2 mg pro ml), einem spezifischem Hemmstoff der Isocitricodehydrogenase, und Leerversuche ohne Substrat ausgeführt.

Das Diterazoliumsalz Nitro-BT ist eines der empfindlichsten Tetrazoliumsalze. Durch Übertragung des Wasserstoffs der Substrate (Succinat, Isocitrat u.a.) wird das gelbe Tetrazoliumsalz zu blauem Diformazan reduziert. Das Diformazan des Nitro-BT zeichnet sich durch die geringe Größe der entstehenden Partikel und durch seine geringe Diffusionsneigung und geringe Lipoidlöslichkeit aus. Neben dem blauen Reaktionsprodukt entsteht in geringer Menge oft eine rotviolette Farbkomponente, deren Entstehung noch nicht restlos geklärt ist. Nach PEARSE sowie BURTNER, BAHN u. LONGLEY handelt es sich um Monoformazane aus Monotetrazoliumsalzen, die den Ditetrazolen als Verunreinigungen beigemischt sind. Nach neueren Untersuchungen von BENEKE u. SIMON (ebenso FARBER, STERNBERG u. DUNLAP sowie KONRAD) handelt es sich um eine unvollständige Reduktion des Ditetrazoliumsalzes zu Monoformazan, welches durch weitere Reduktion in das entsprechende Diformazan übergeht. Der gleichen Meinung sind auch SELIGMAN u. RUTENBERG, die das rote Reaktionsprodukt mit geringerer, das blaue mit stärkerer Fermentaktivität gleichsetzen.

Die Inkubationslösungen aller Fermentreaktionen wurden grundsätzlich erst unmittelbar vor der Inkubation hergestellt.

6.) Scharlachrot (SR) (Sudan IV)

Die fixierten und gespülten Zellen wurden folgendermaßen behandelt:

kurz in 50%igen Alkohol,

15 Minuten in einem gut verschlossenen Gefäß in eine 0,2%ige Lösung von Scharlachrot in 70%igem Alkohol,

kurz in 50%igen Alkohol.

Scharlachrot reichert sich in Fettstoffen an, und zwar vor allem in Neutralfetten, Cholesterin und seinen Estern und weniger gut in den anderen Fettstoffen.

6a.) SD/SR-Doppelfärbung

Ein großer Teil der durch die Succinodehydrogenase-Reaktion gefärbten Präparate wurde nachträglich mit Scharlachrot gegengefärbt.

7.) Sudan Schwarz B (SB)

Die Zellen wurden genau wie unter 6.) behandelt. Statt in Scharlachrot wurden sie für 3 Stunden - ebenfalls in gut verschlossenen Gefäßen - in eine 0,1%ige Sudan Schwarz B-Lösung in 70%igem Alkohol gebracht.

Gefärbt werden durch Sudan Schwarz B alle Fettstoffe, vor allem

aber Phospholipide, auch Cerebroside. Bei der langen Färbedauer von 3 Stunden können Fettstoffe, die in der Zelle wenig fixiert sind, vor allem Neutralfette, durch den Alkohol herausgelöst werden.

Als Kontrolle bei der Darstellung der Fettstoffe wurde die Fettextraktion nach BAKER ausgeführt (siehe LIPP, Heft 16).

8.) PAS-Reaktion (PAS) (nach HOTCHKISS und McMANUS)

Ausführung in der üblichen Weise.

Als Kontrollversuch wurde die Azetylierung/Entazetylierung durchgeführt (siehe LIPP, Heft 1), und zur Kontrolle auf Glykogen ließen wir vor Ausführung der PAS-Reaktion 60 Minuten bei 37°C Speichel bzw. 1%ige Diastase einwirken.

9.) Hämatoxylin/Eosin (HE)

Ausführung in der üblichen Weise.

V. Auswertungsmethoden

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellen wurde die Lokalisation der einzelnen histochemischen Reaktionen innerhalb der Einzelzellen studiert. Sodann wurden für die verschiedenen Reaktionen geeignete Gesichtspunkte festgelegt, nach denen eine Beurteilung der Reaktionsintensität der Einzelzelle möglichst objektiv bestimmbar war. Dabei wurden nur deutlich abgrenzbare Zellen gewertet.

1.) Alkalische Phosphatase: Bei 160facher Vergrößerung wurden 200 Zellen hinsichtlich ihrer Farbintensität in folgende Gruppen eingereiht:

negativ	(-)	blaßgelb
schwach positiv	(+)	hellblau strukturiert
stark positiv	(++)	dunkelblau strukturiert
sehr stark positiv	(+++)	vorwiegend homogen schwarzblau

2.) Saure Phosphatase: Es wurden 200 Zellen bei 1600facher Vergrößerung in folgende Gruppen eingereiht:

negativ	(-)	blaßgelb
schwach positiv	(+)	einzelne rote Granula
stark und sehr stark positiv	} (++)	{ zahlreiche rote Granula und diffuse rote Untergrundfärbung

3.) Amino-peptidase: Wegen der schlechten Lokalisierbarkeit und der geringen Reaktionsunterschiede dieses Ferments begnügten wir uns hier mit einer summarischen Schätzung des Anteils positiver und negativer Zellen und Einteilung in "negative", "einfach und zweifach positive" Präparate (bei 160-facher Vergrößerung).

4.) Succinodehydrogenase: In 100 Zellen wurden die blauschwarzen Granula ausgezählt (bei 1600-facher Vergrößerung) und die Zellen danach in 4 Gruppen eingeteilt:

negativ	(-)	0	Granula
schwach positiv	(+)	1-10	"
stark positiv	(++)	11-20	"
		21-30	"
		31-40	"
sehr stark positiv	(+++)	mehr als 40	"

Die Untergrundfärbung wurde quantitativ nicht gesondert bewertet, sie wurde aber hinsichtlich der Farbe, Ausdehnung und Intensität beachtet.

5.) Isocitricodehydrogenase: Auswertung von 100 Zellen bei 1600-facher Vergrößerung:

negativ	(-)	blaßgelb
schwach positiv	(+)	einzelne blaue Granula
stark und sehr stark positiv	(++)	{ zahlreiche blaue Granula und andere blaue Strukturen

Für die Untergrundfärbung gilt das unter 4.) Gesagte.

6.) Scharlachrot: Auswertung von 100 Zellen bei 1600-facher Vergrößerung:

negativ	(-)	keine Rotfärbung
schwach positiv	(+)	einzelne kleine rote Tröpfchen
stark positiv	(++)	zahlreiche rote Tropfen und Flecken

7.) Sudan Schwarz B: 100 Zellen bei 1600-facher Vergrößerung:

negativ	(-)	keine schwarzgefärbten Strukturen, Zellen grau bis braun
schwach positiv	(+)	einzelne schwarze Tröpfchen
stark positiv	(++)	zahlreiche schwarze Tropfen und große Flecken

Nur bei sehr sorgfältiger Betrachtung konnten die oft sehr zahlreich an der Zelloberfläche liegenden unspezifischen Sudanschwarz-niederschläge von dem in den Zellfetten angereicherten Farbstoff

unterschieden werden. Die spezifischen Farbstoffansammlungen waren meist unregelmäßig begrenzt, während die Niederschläge kreisrund waren, wie sich an den zwischen den Zellen auf der Glasoberfläche liegenden Niederschlägen leicht feststellen ließ.

8.) PAS-Reaktion: Summarische Schätzung der Farbtintensität der Zellen bei 160-facher Vergrößerung und Einteilung in "einfach und zweifach positive" Präparate.

9.) Morphologie: Die bei den einzelnen Färbungen gemachten Beobachtungen hinsichtlich Lagerung, Größe, Form u. a. der Zellen, der Kerne usw. ergänzten sich gegenseitig zum morphologischen Gesamtbild der Zellen.

Die Ergebnisse der semiquantitativen Bewertungen wurden graphisch dargestellt. Von den Präparaten fertigten wir schwarzweiße und z. T. auch farbige Photographien an.

C. Ergebnisse eigener Untersuchungen

1.) Alkalische Phosphatase

Suspensionszellen zeigten in allen Proben eine etwa gleichstarke Reaktion, wobei jeweils über 90% der Zellen eine "schwach bis stark positive" Reaktion (+ bis ++) gaben, und zwar als diffuse Blaufärbung des gesamten Cytoplasmas mit feinen bis groben dunkelblauen runden oder stäbchenförmigen Granula, die sich vor allem in den peripheren Abschnitten und in der Zelloberfläche fanden. An der Oberfläche waren außerdem oft blasenartige Ausstülpungen und zarte schleierartige Fortsätze hellblau angefärbt. Kerne und Nukleolen blieben immer ungefärbt.

Die Deckglaskulturen zeigten immer eine intensive Reaktion, und zwar in ähnlicher Form wie die Suspensionszellen. Die Färbung oberflächlicher Faltenbildungen und zarter Ausstülpungen war bei den Deckglaskulturen noch deutlicher (Abb. 8e u. 9f, Pfeile), dagegen ließ sich meist nicht sicher entscheiden, ob die Granula im Zellinneren oder in den oberflächennahen Abschnitten lagen, da die Zellen zu flach waren.

Eine "sehr stark positive" Reaktion, d. h. homogene schwarzblaue Färbung zeigten die kleinen jungen Rundzellen der Wachstumszentren, während die spindeligen und polygonalen, auf der Oberfläche angewachsenen Zellen kurz nach der Auspflanzung meist eine "schwach

positive" oder sogar "negative" Reaktion boten.

In den Kulturen mit höherer Zellkonzentration traten dann sehr bald kleine geschrumpfte runde Zellen auf, die wieder homogen schwarzblau gefärbt waren(+++). Aus der Abb. 2d ergibt sich z.B. eine Zunahme der "sehr stark positiven"(+++) Zellen von 0% am 1. Tag auf 10% am 4. Tag. Oft hatten diese kleinen dunklen Zellen noch spinnenartige strahlige Ausläufer, die ebenfalls schwarzblau gefärbt waren(Abb. 8h).

Bei den großen Zellen, wie sie sich bei den Kulturen mit niedriger Zellkonzentration im Laufe einiger Tage entwickelten, verstärkte sich die Reaktion in zunehmendem Maße in einer umschriebenen paranukleären Zone(Abb. 8f), die bei schwacher Vergrößerung homogen schwarzblau, bei starker Vergrößerung dicht gekörnt erschien. Auch bei diesen Kulturen sahen wir an späteren Tagen vermehrt kleine geschrumpfte runde Zellen mit "sehr starker Positivität"(+++), nämlich 9-18% an späteren Tagen gegenüber nur 2% am 1. Tag(Abb. 5e).

In allen Kulturen färbten sich auch zwischen den intakten Zellen liegende Reste abgelöster Zellen in Form von spinnwebartigen oder dicht granulierten Gebilden oder kleinen Blasen mehr oder weniger stark blau an(Abb. 8h).

Ohne das Substrat Naphthol-AS-TR-Phosphat war die Reaktion völlig negativ, mit Alloxan(10 und 20 mg pro ml) ließ sie sich deutlich abschwächen.

2.) Saure Phosphatase

S u s p e n s i o n s z e l l e n gaben in allen Proben eine ziemlich gleichmäßig starke Reaktion in Form einer diffusen bzw. sehr fein granulierten Rotfärbung des Cytoplasmas, wobei eine angedeutet halbmondförmig paranukleäre Zone besonders hervortrat. Außerdem waren über das gesamte Cytoplasma dunkel- bis schwarzrote mittelfeine Granula verteilt. Kerne und Nukleolen blieben immer reaktionslos. In allen Proben fanden sich immer einige völlig negative Zellen.

Die D e c k g l a s k u l t u r e n boten eine sehr gleichmäßig intensive Reaktion, und zwar waren an den ersten Tagen 100% der Zellen "stark und sehr stark positiv"(Abb. 2c u. 5d). Die bevorzugt paranukleäre diffuse Färbung war bei den stationären, besonde-

bei den großen Zellen der niedrigkonzentrierten Kulturen sehr deutlich (Abb. 9a). Die Granula fanden sich meist auch in den anderen Cytoplasmateilen, jedoch war die Peripherie oft völlig negativ.

In allen Kulturen traten nach einigen Tagen negative Zellen auf, und zwar umso früher und mehr je größer die Zelldichte war: So waren es bei hoher Zelldichte (200 000 Zellen pro ml) am 4. Tag schon 40% (Abb. 2c), bei mittlerer Dichte (150 000 Zellen) am 6. Tag erst 4,5% (Abb. 4e), am 9. Tag jedoch schon 55% (Abb. 4e), während bei geringer Zellzahl (50 000) am 9. Tag nur 2% der Zellen reaktionslos waren (Abb. 5d).

"Schwach positive" (+) Zellen hatten nur einige positive Granula ohne diffuse Färbung des Untergrundes;

Ohne das Substrat Naphthol-AS-TR-Phosphat blieb die Reaktion immer negativ.

3.) Amino-peptidase

Die S u s p e n s i o n s z e l l e n zeigten einen sehr wechselnden Reaktionsausfall: In einigen Proben waren alle Zellen völlig negativ, in anderen war ein Teil der Zellen schwach positiv, und zwar als diffuse bzw. feingranulierte braungelbe Färbung mit unregelmäßigen braungelben Gebilden, die z.T. auf der Oberfläche lagen.

Die Zellen der D e c k g l a s k u l t u r e n reagierten in sehr gleichmäßiger Stärke (im Gegensatz zu den Suspensionszellen). Das ganze Cytoplasma stellte sich feinkörnig dar, peripher blaßgelb, nach zentral braungelb werdend, am dichtesten und intensivsten paranukleär (Abb. 9i). Im zentralen Plasma fanden sich oft große braungelbe Schollen.

Die Reaktion war in allen Zellen ziemlich gleichmäßig wenig abgeschwächt, wenn sich morphologisch und im Verhalten der anderen Fermente schon deutliche Degenerationserscheinungen zeigten. Siehe dazu Abb. 4f und 5f: "++"-Reaktion bis zum 8. und "+"-Reaktion am 9. Tag.

Ohne Substrat war die Reaktion in den Zellen selbst völlig negativ. An den Oberflächen lagerten sich jedoch bei einem Teil der Zellen rotbraune kristalline Niederschläge ab, so daß diese Gebilde als unspezifisch, durch Ausfällung des Diazoniumsalzes bedingt, angesehen werden müssen.

4.) Succinodehydrogenase

Bei den S u s p e n s i o n s z e l l e n war die Reaktionsstärke der verschiedenen Proben ziemlich gleichmäßig intensiv. Immer waren über 90% der Zellen "stark und sehr stark positiv" (++und+++). Das Reaktionsprodukt erschien in Form schwarzblauer Granula und oft als diffuse rot-bis blauviolette Färbung des Untergrundes. Sehr oft beschränkte sich die positive Reaktion auf die zentrale, perinukleäre Zone des Cytoplasmas. In manchen Zellen sah man statt der blauschwarzen Granula oder mit diesen zusammen perlenkettenartige oder verzweigte Strukturen, die oft der Kernmembran unmittelbar auflagern. Zwischen dem Ausmaß der granulären Reaktion und der Intensität der diffusen Untergrundfärbung bestand eine gewisse Parallelität: Zellen mit vielen positiven Granula zeigten meist auch eine stärkere Untergrundfärbung, Zellen mit wenigen Granula eine schwache oder gar keine Färbung des Untergrundes.

Bei den s t a t i o n ä r e n Z e l l e n war die Reaktionsform die gleiche. Bei den großen Zellen, wie sie sich bei geringer Zelldichte nach einigen Tagen entwickelten, war die Bevorzugung der zentralen, perinukleären Cytoplasmateile besonders deutlich (Abb. 8a und 8b).

In allen Kulturen waren am 1. Tag 100% der Zellen positiv (Abb. 1a, 2a, 3a, 5a). Wie bei der sauren Phosphatase traten nach einigen Tagen in zunehmendem Maße negative Zellen auf, umso früher und mehr, je höher die Zelldichte war: Bei sehr hoher Zelldichte (220 000 Zellen pro ml) waren es am 3. Tag 76% negative Zellen (Abb. 1a), bei mittlerer Dichte (150 000 Zellen) nur 3% (Abb. 3a), und bei geringer Dichte (50 000 Zellen) traten die ersten negativen Zellen erst am 5. Tag mit 1% auf (Abb. 5a).

Die ohne Substrat ausgeführten Kontrollen zeigten eine geringere, aber immer noch erhebliche Reduktion des Tetrazoliumsalzes. Mit Malonat (3,3/5/10 mg pro ml) ließ sich die Aktivität deutlich hemmen, doch nicht völlig unterdrücken.

Zum Nachweis, daß es sich bei diesen ohne zugesetztes Succinat ablaufenden Reaktionen um die Oxydation endogener Substrate handeln muß, wurden Suspensionzellen als Sediment (S u s p e n s i o n s z e l l s e d i m e n t) und ohne Nährlösung mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt und mit der SD-Reaktion mit und ohne

Succinat untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Differenzen zwischen der Aktivität mit zugesetztem Succinat ("spezifisch") und der ohne Succinat ("unspezifisch") mit zunehmender Dauer des "Hungerzustandes" immer größer wurden: Am 2. Tag z.B. 93% "sehr stark positiver" Zellen(+++) bei spezifischer und 71% bei unspezifischer Reaktion, dagegen am 6. Tag ein Verhältnis von 82 zu 26% "sehr stark positiver" Zellen. Am 9. Tag waren beide Reaktionen auf etwa gleich niedrige Werte abgefallen (Abb. 6).

Bei der spezifischen Reaktion traten vom 2. Tag an neben den scharf begrenzten blauschwarzen Granula solche von plumperer und größerer Form und einer ins Rotviolette spielenden Farbe auf. Bei einigen dieser Körper ließen sich ein blauschwarzes Zentrum und ein violetter Rand unterscheiden. Die Untergrundfärbung wechselte von blauviolett in den ersten Tagen über rotviolett bis z.T. blaß orangerot in den letzten Tagen. Bei der unspezifischen Reaktion waren die Granula dagegen immer klein, blauschwarz und scharf begrenzt. Der Untergrund war nur in den ersten Tagen blaßblau-bis rotviolett gefärbt, später meist völlig reaktionslos.

In beiden Reihen waren die Granula meist sehr deutlich auf die zentrale perinukleäre Cytoplasmazone beschränkt. Die Untergrundfärbung war sehr oft kappenförmig paranukleär verstärkt oder ebenfalls auf diese Zone beschränkt.

5.) Isocitricodehydrogenase

Das Reaktionsprodukt lagerte sich hier als blauschwarze Granula, mehr aber noch als komma- oder stäbchenförmige Gebilde ab. Diese saßen oft astartig bizarr verzweigt oder perlschnurförmig aneinandergereiht unmittelbar der Kernmembran auf (Abb. 9c). Der Untergrund war oft diffus rot-bis blauviolett gefärbt. Ebenso wie bei der SD-Reaktion beobachteten wir auch hier eine gewisse Parallelität zwischen dem Ausmaß der granulären und der diffusen Reaktion.

Die S u s p e n s i o n s z e l l e n hatten in allen Proben nur wenige % negative Zellen. Auffallend war die sehr unterschiedliche Intensität der Untergrundfärbung.

Bei den D e c k g l a s k u l t u r e n wurden nur solche mit hoher und mittlerer Zelldichte untersucht, z.T. auch mit unterschiedlichen Inkubationszeiten, so daß Vergleiche nur bedingt

möglich sind.

Der Aktivitätsabfall mit zunehmendem Alter war jedoch auch erkennbar, er war meist etwas geringer als der der SD-Reaktion (Abb. 2b, 3b, 4b).

Die Kontrollen ohne Substrat zeigten eine herabgesetzte Aktivität. Mit Adenosin-2'-monophosphat (2 mg pro ml) ließ sich die Reaktion stark abschwächen.

6.) Scharlachrot

Die S u s p e n s i o n s z e l l e n enthielten in verschiedenen Proben in unterschiedlicher Zahl Zellen mit scharlachrot-positiven Substanzen. Die schwächste Probe enthielt 16%, die stärkste Probe 69% positiver Zellen. Der Farbstoff war in ungleich großen, meist feinen Tropfen im gesamten Cytoplasma verteilt.

Unter den Zellen der D e c k g l a s k u l t u r e n fanden sich ebenfalls immer mehr oder weniger zahlreiche scharlachrot-positive. Bei fast allen Kulturen war eine eindeutige Zunahme solcher Zellen und bei diesen eine Zunahme des Farbstoff- bzw. Fettgehalts feststellbar. Die Zunahme erfolgte am langsamsten bei geringer, am schnellsten bei hoher Zelldichte. Positiv waren z.B. am 3. Tag bei hoher Zellkonzentration 80% (Abb. 1b), bei mittlerer 44% und bei geringer nur 11% (Abb. 3c bzw. 5b).

Der Farbstoff sammelte sich bei den kleinen Zellen der zell-dichten Kulturen als kleinste bis große Tropfen in allen Abschnitten des Cytoplasmas an. Bei den großen, flach ausgebreiteten Zellen der zellärmeren Kulturen reicherte sich das Scharlachrot zu meist größeren, unregelmäßig begrenzten Farbseen in der intermediären Zone der Zelle an, d.h. sowohl die Peripherie als auch die paranukleäre Golgi-Zone blieben ausgespart (Abb. 8d).

In den SD-vorgefärbten Präparaten sammelte sich vor allem in den SD-schwachen oder -negativen Zellen viel Scharlachrot an, und umgekehrt waren die stark SD-positiven Zellen meist SR-negativ. Außerdem sahen wir in allen Kulturen Zellen, die kleine, unregelmäßig geformte Anhängsel mit feintropfig angereichertem Scharlachrot besaßen (Abb. 9g). Solche Gebilde lagen auch sehr oft isoliert zwischen den Zellen.

Parallel mit der Darstellung der Succinodehydrogenase führten

wir die Scharlachrotfärbung auch bei dem bei 4°C aufbewahrten S u s p e n s i o n s z e l l s e d i m e n t aus. Auch hier zeigte sich eine Zunahme der positiven Zellen von z.B. 47% frisch nach der Entnahme auf 95% am 9.Tag (Abb. 6 u. 7).

Nach der Durchführung der Fettextraktion nach BAKER war die Färbung immer negativ.

7.) Sudan Schwarz B

Frisch entnommene S u s p e n s i o n s z e l l e n waren etwa zu 50% schwach positiv in Form unregelmäßiger und ungleich großer dunkelgrauer Schatten im Cytoplasma. Kerne und Nukleolen blieben ungefärbt.

Bei den D e c k g l a s k u l t u r e n führten wir diese Färbung nicht immer aus, da ihre Ergebnisse auf Grund der starken Niederschläge unbefriedigend waren.

Es zeigte sich, daß sudan-schwarz-positive Substanzen schon zu einem Zeitpunkt deutlich nachweisbar waren, an dem die Färbung mit Scharlachrot nur sehr schwach positiv war (Abb. 4d u. 5c). Bei der in Abb. 5 dargestellten Kultur waren die Zellen an den späteren Tagen dann wieder zum größten Teil negativ, während die SR-positiven Zellen immer mehr zunahmen.

Bei den großen und flachen Zellen der zellarmen Kultur (Abb. 5) stellte sich die Golgi-Zone mit zahlreichen kleinen schwarzen Granula dar, kranzförmig umgeben von dicken runden schwarzen Tropfen. Die Peripherie der Zelle wurde mit Sudan B nicht dargestellt (Abb. 8c).

Einen ähnlichen Befund, nämlich einen vorübergehenden Anstieg positiver Zellen mit dem Maximum am 3. Tag (62 bzw. 70%) sahen wir bei den Zellen des S u s p e n s i o n s s e d i m e n t s (Abb. 6 u. 7).

8.) PAS-Reaktion

S u s p e n s i o n s z e l l e n waren immer zu 100% positiv, und zwar feinkörnig bis grobschollig in der perinukleären Zone mit stärkerer Ausdehnung in einem paranukleären Bezirk.

Zellen der D e c k g l a s k u l t u r waren ebenfalls immer positiv, und zwar umso deutlicher mit Bevorzugung der paranukleären Zone, je größer die Zelle war. Diese Zone erschien dabei fein

und gleichmäßig gekörnt.

Eine Abnahme der Reaktionsstärke war erst dann feststellbar, wenn die meisten anderen Reaktionen schon stark verändert waren, jedoch waren die Veränderungen der PAS-Reaktion auch dann noch sehr gering. Aus der Abb. 4g ergibt sich z.B. eine "++"-Reaktion bis zum 7. und eine "+"-Reaktion am 9. Tag, in Abb. 5 ist die PAS-Reaktion sogar bis zum 10. Tag unverändert gleich, nämlich "++".

Nach Einwirkung von Diastase bzw. Speichel trat keine Verminderung der Reaktionsstärke ein. Nach Azetylierung waren alle Zellen negativ, nach Entazetylierung wurde ein Teil der Zellen wieder schwach positiv.

9.) Morphologie

Zur Beurteilung der Morphologie eignete sich am besten die aPh-Reaktion, da bei dieser auch die periphersten Zellteile noch dargestellt werden, und - soweit sie ausgeführt wurde - die einfache HE-Färbung.

Die Suspensionszellen waren ziemlich gleichmäßig groß, etwa 10-20 μ , rund bis oval geformt. Sie lagen einzeln oder sehr oft paarweise, z.T. auch in größeren Konglomeraten, wobei sie durch gegenseitiges Abplatten eine mehr polygonale Form erhielten. Sie besaßen in der Regel einen Kern, der unregelmäßig rund, oval oder nierenförmig konfiguriert war. Er enthielt meist mehrere große und plumpe Nukleolen. Das Cytoplasma war in der Regel nur ein schmaler Saum, z.T. mit kleinen Vakuolen, der oft noch kleine blasige oder fransen- und schleierartige Anhängsel besaß.

Bei mittlerer und hoher Zelldichte der Deckglas-kulturen entstand schon in den ersten Tagen ein dichter Zellrasen aus vorwiegend spindeligen oder polygonalen Zellen mit schlanken Ausläufern. Diese Zellen lagen zum größten Teil dicht aneinander und bildeten mehr oder weniger geschlossene epithelartige Flächen. Runde Zellen waren selten und lagen meist einzeln. Die Größe der Zellen wechselte stark, es fanden sich ausgesprochene Riesenformen (bis ca. 100 μ). Die Kerne und Nukleolen waren wie bei den Suspensionszellen sehr polymorph. Große und Riesenzellen waren meist mehrkernig. Im Cytoplasma sah man selten kleine Vakuolen, an der Zellperipherie häufig zarte blasige Ausstülpungen oder fransenartige Ausläufer. Im Lauf der weiteren Tage verringerte sich

die Zahl der Zellen auf der Glasoberfläche, die Dichte der Zellen verminderte sich. Der epitheliale Charakter der Zellen verschwand, neben den polygonalen Zellen fanden sich jetzt zahlreiche runde. Die Größe der Zellen verringerte sich mit zunehmendem Alter, ebenso die der Kerne. In den kleinsten Zellen lagen die Kerne oft exzentrisch. Im Cytoplasma entstanden vermehrt Vakuolen. An späten Tagen fanden sich oft Zellen, die in der Peripherie grobe runde Verdickungen oder langausgezogene strahlige Ausläufer hatten. Zwischen den Zellen lagen mehr oder weniger reichlich die Reste von Zellen, die sich offensichtlich von der Glasoberfläche gelöst hatten und in das Nährmedium abgeschwommen waren. Diese Zellreste stellten sich nur bei der aPh-Reaktion dar und sind dort beschrieben.

Bei sehr hoher Zellkonzentration blieben die Zellen klein und rund, spindelige oder polygonale Zellen entwickelten sich nur selten. Es entstanden keine geschlossenen Kolonief Flächen, vielmehr lagen die Zellen ungeordnet neben- und übereinander.

Bei geringer Zelldichte wurden die Zellen wesentlich größer. Geschlossene Epithelflächen entstanden erst nach einigen Tagen. An späteren Tagen bildeten sich in vielen Zellen sehr große Vakuolen. Es fanden sich dann auch einzelne kleine geschrumpfte Zellen und zwischen den Zellen reichlich Zellreste.

Zusammenfassung der Befunde

Fassen wir die dargestellten Beobachtungen kurz zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

Alle untersuchten Fermente waren sowohl in den stationären als auch in den Suspensionszellen nachweisbar.

Bei den stationären Zellen traten mit zunehmendem Alter (gerechnet vom Tag der Umpflanzung) Veränderungen der Fermentaktivitäten in der Weise auf, daß die oxydativen Enzyme und die saure Phosphatase und weniger deutlich die Amino-peptidase in ihrer Aktivität nachließen, die alkalische Phosphatase dagegen mit zunehmendem Alter sich deutlicher darstellte. Weiterhin ließ sich eine Zunahme der histochemisch darstellbaren Fettsubstanzen nachweisen, während die PAS-Reaktion nur sehr geringe Intensitätsunterschiede zeigte.

Alle diese Veränderungen traten umso früher in Erscheinung und waren umso deutlicher, je höher die Zelldichte der Kulturen

war.

Die wichtigsten morphologischen Feststellungen waren das Anwachsen der Zellen auf der Glasoberfläche nach der Umpflanzung, die folgende mehr oder weniger starke Größenzunahme der Zellen und die Tatsache, daß sich früher oder später ein mehr oder weniger großer Teil der Zellen von der Oberfläche wieder ablöste, während die weiterhin haftenden Zellen wieder kleiner wurden. Die größten Zellen entwickelten sich bei der geringsten Zelldichte, bei den hohen Zellkonzentrationen blieben alle Zellen sehr klein.

D. Diskussion der Befunde

Die kurze Zusammenfassung der erhobenen Befunde, vor allem auch die offensichtliche Abhängigkeit der Veränderungen von der Zelldichte, d.h. von der Menge der der Einzelzelle zur Verfügung stehenden Nährstoffe, rechtfertigt schon bei flüchtiger Überlegung die Vermutung, daß die beobachteten Phänomene Ausdruck der Alterung und Degeneration der Zellen seien.

Im folgenden sollen nun die Bedeutung der beobachteten Erscheinungen für den Zellstoffwechsel der Hela-Zelle, die methodischen Besonderheiten und die Aussagekraft der einzelnen Reaktionen ausführlich besprochen werden. Vor allem wird dabei die schon geäußerte Vermutung begründet und bestätigt werden können, daß die morphologischen und histochemischen Veränderungen der Zellen tatsächlich als Alterungs- und Degenerationserscheinungen zu deuten sind.

Wie unten erläutert werden wird, nehmen die oxydativen Fermente eine zentrale Stellung im Zellstoffwechsel ein; besonders die Succinodehydrogenase-Reaktion bzw. die der endogenen Reduktasen ist - nicht zuletzt auch aus methodischen Gründen - ein guter Indikator für die gesamte Stoffwechsellage der Zellen.

Wir beginnen deshalb mit der Besprechung der oxydativen Enzyme. Wegen des engen Zusammenhanges zwischen oxydativem Stoffwechsel und dem Verhalten der Fettstoffe besprechen wir dann die Fettreaktionen und abschließend die übrigen Reaktionen und das morphologische Verhalten der Zellen.

1.) Succinodehydrogenase

Die Funktion der Succinodehydrogenase besteht in der Oxydation der Bernsteinsäure zu Fumarsäure innerhalb des Zitronensäurezyklus, wobei der Bernsteinsäure zwei Wasserstoffatome entzogen werden.

In zahlreichen Untersuchungen ist nachgewiesen worden, daß dieses Ferment - wie auch die anderen Enzyme des Zitronensäurezyklus - fast ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist (BARNETT; DeDUVE u. BERTHET; HIRSCH; NOVIKOFF, PODBER, RYAN u. NOE; PEARSE, SCARPELLI u. HESS; SCARPELLI u. a.). Wir können deshalb annehmen, daß die blauschwarzen Formazangranula die Orte der Mitochondrien darstellen.

Bei unseren Zellen sahen wir oft eine deutliche Anhäufung der Granula bzw. Mitochondrien in den zentralen, d.h. perinukleären Cytoplasmaabschnitten, was nicht nur durch die größere Dicke der Zelle in ihrem Zentrum vorgetäuscht sein kann, da sich in der Peripherie oft gar keine Positivität fand, vor allem bei größeren und ausgebreiteten Zellen. Wahrscheinlicher spricht dieses Verhalten doch für eine gewisse Beeinträchtigung der Zellen, wir sahen dieses Phänomen ja vor allem auch bei den älteren, ausgebreiteten Zellen. Bei den Suspensionszellen stellt wohl die Trypsinierung diese Beeinträchtigung dar. Ähnliche Mitteilungen fanden wir auch bei ZEIGER und bei ALTMANN. Ersterer berichtet über eine Zusammenziehung des Chondrioms nach Schädigung von Osteoblastenkulturen in vitro. ALTMANN sieht in diesem Verhalten eine sinnvolle Reaktion der Zelle auf eine Störung des Zellstoffwechsels, mit der die gesamte Aktivität der Zelle auf die Erhaltung des wichtigen Zellzentrums gerichtet wird.

FORTELIUS beschreibt eine Verteilung der formazanpositiven Granula über das gesamte Cytoplasma seiner Hela-Zellen. Diese wuchsen jedoch offensichtlich unter günstigeren Bedingungen (keine Aktivitätsabnahme der Succinodehydrogenase, Erneuerung des Nährmediums), was diesen Unterschied gegenüber unseren Zellen erklären kann.

Dank der Funktion der Succinodehydrogenase im Zitronensäurezyklus, der ja eine zentrale Bedeutung im Zellstoffwechsel hat, und dank ihrer recht guten semiquantitativen Beurteilbarkeit ist die Intensität der Succinodehydrogenase-Reaktion ein geeigneter Indikator für die gesamte Stoffwechsellage der Zelle. Tatsächlich wurde

bei unserer Methode neben der spezifischen Succinodehydrogenase-Reaktion die gesamte sogenannte "endogene Dehydrogenase-(oder Reduktase-)Aktivität" erfaßt. Man versteht darunter das Ausmaß der Tetrazoliumreduktion, die ohne Zugabe eines spezifischen exogenen Substrats erfolgt (RUTENBERG u. GOFSTEIN; VERNE u. WEGMAN; YOUNG u. EDWARDS). Sie ist bedingt durch die in der lebenden Zelle ablaufenden Oxydationsvorgänge, bei deren Ablauf Wasserstoff verschoben und in Gegenwart von Tetrazoliumsalzen auch auf diese übertragen wird. Nach IVERSEN gibt die "endogene Reduktaseaktivität" in ungefährer Relation ein Bild der gesamten Stoffwechselaktivität der Zelle. Wir hielten es deshalb für richtiger, diese Reaktionen nicht zu unterdrücken, wie es KAUFMAN u. HILL sowie FORTÉLIUS durch kurzzeitiges sehr starkes Abkühlen bzw. kurzes Eintauchen in 60%iges Azeton erreichten. Zu einem Teil soll die Reduktion des Tetrazoliums durch SH-Gruppen bedingt sein (SCHREIBER u. SIMON). Doch scheinen uns Hemmungsversuche mit Jodazetamid, einem SH-Blocker, kein überzeugendes Argument gegen enzymatische Reduktion zu sein, da viele spezifische Fermentreaktionen SH-Gruppen benötigen, z.B. Succinodehydrogenase, Aldehyd- und Alkoholdehydrogenase, 3-Phosphoglyzerinaldehyddehydrogenase u.a. (AMMON u. DIRSCHERL).

Die neben den positiven Granula sichtbare diffuse Untergrundfärbung ist wohl vor allem auf die "endogenen Reduktasen" zurückzuführen, da Succinodehydrogenase außerhalb der Mitochondrien kaum vorhanden ist.

Nach den Angaben vieler Untersucher (BUTENANDT; AMMON u. DIRSCHERL) ist die Aktivität der Succinodehydrogenase in den meisten Tumoren gegenüber normalen Zellen herabgesetzt. Auch die Zahl der Mitochondrien und ihre enzymatische Oxydationskraft sollen vermindert sein. Trotzdem unterscheidet sich der Tumorzellstoffwechsel nur quantitativ-graduell vom normalen, und eine Abnahme der Fermentaktivitäten hat für die einzelne Carcinomzelle prinzipiell die gleiche Bedeutung wie für die normale Zelle.

An alternden Hela-Zellen wurde die Succinodehydrogenase von FORTÉLIUS (1963) untersucht. Er fand bei seinen Versuchen, bei denen er eine Zellkonzentration von 50 000 pro ml wählte, das Nährmedium nach spätestens 5 Tagen erneuerte und die endogenen Reduktasen unterdrückte, keine Abnahme der SD-Aktivität. Bei etwa ver-

gleichbaren Bedingungen (gleiche Zelldichte, jedoch keine Erneuerung des Nährmediums) sahen wir eine geringe Aktivitätsabnahme. Dabei muß man allerdings berücksichtigen, daß ein geringer Abfall der Aktivität für die Einzelzelle einen relativ viel stärkeren Verlust bedeutet, da sie wächst und sich ihr Stoffwechsel eher intensivieren müßte.

In jedem Falle führen wir die schwächer oder stärker sichtbare Aktivitätsabnahme in erster Linie auf einen Verbrauch des Nährmediums zurück, deuten sie also als Substratmangelhypoxydose mit folgender Degeneration. Dabei vermuteten wir, daß die Abnahme zunächst durch die verminderte Tätigkeit der endogenen Reduktasen infolge der Verringerung der endogenen Substrate bedingt sei, die dann von einer echten Aktivitätsabnahme der Succinodehydrogenase gefolgt würde.

Zur Überprüfung dieser Vorstellungen ließen wir die Zellen als Sediment ohne Nährlösung bei 4°C langsam "verhungern". Tatsächlich nahm die Aktivität der endogenen Reduktasen sehr bald stark ab, wobei zunächst die diffuse Untergrundfärbung verschwand. Bei dem geringen Substratangebot und der Beeinträchtigung der Mitochondrienstruktur blieben offensichtlich nur noch einige wenige Mitochondrien in der Lage eines ausreichenden Oxydationsvermögens. Bei exogener Succinatzugabe blieb die Zahl der positiven Mitochondrien wesentlich länger noch relativ hoch. Die vermehrt auftretenden groben und plumpen, oft rotviolettten Granula entsprachen vermutlich aufgequollenen Mitochondrien. Die in den letzten Tagen auftretende diffuse Rotfärbung ist Ausdruck der schwachen und unvollständigen Reduktion des Nitro-BT und anschließenden Diffusion des Monoformazans. Geschwollene Mitochondrien stellten sich durch endogene Reduktasen nicht dar, nahmen also am Zellstoffwechsel in vivo nicht mehr teil. Die endogenen Dehydrogenasen der Mitochondrien arbeiten offensichtlich nach dem "Alles-oder-Nichts-Gesetz": Sie reduzieren das Nitro-BT entweder vollständig (blauschwarze Di-formazangranula) oder gar nicht (Rotfärbung durch Monoformazan trat nicht auf). Wir schließen daraus, daß zunächst tatsächlich nur die Struktur der Mitochondrien, d.h. die regelrechte Anordnung und Verteilung der einzelnen Fermente verändert ist, und zwar in der Weise, daß der räumliche Zusammenhang innerhalb der oxydativ-reduktiven Ferment-Re-

aktionsketten unterbrochen ist. Durch eine sinnvolle räumliche Anordnung der Enzyme ist ja ihr unabdingbares Zusammenspiel bei der Oxydation der endogenen Substrate erst möglich. Dagegen sind die einzelnen Fermente für sich zunächst noch für eine gewisse Zeit funktionstüchtig. Die Succinodehydrogenase z.B. vollbringt ja bei exogener Succinatzugabe noch deren Oxydation, wenn auch in zunehmend geringerem Maße, was an der zunehmend unvollständigen Reduktion des Nitro-BT zu nur noch rotem Monoformazan abzulesen ist.

2.) Isocitricodehydrogenase

Dieses Ferment katalysiert bekanntlich die Decarboxylierung und Dehydrogenierung des Isocitrats zum α -Ketoglutarat. Es benötigt als Coferment TPN oder DPN (LEUTHARDT; KARLSON; PLAUT u. SUNG; PEARSE). Wir verwendeten DPN (obwohl das Ferment mit TPN stärker reagieren soll), und zwar einmal aus finanziellen Gründen, zum anderen aber auch, weil nach PEARSE die DPN-gesteuerte Isocitricodehydrogenase auf die Mitochondrien beschränkt ist, während die TPN-abhängige Reaktion bei ungeschützten Mitochondrien vorwiegend extramitochondrial ablaufen soll, und aus diesem Grund mit DPN eine klarere Lokalisation zu erwarten war.

Im übrigen trifft das bei der Succinodehydrogenase im wesentlichen auch für die Isocitricodehydrogenase zu, da beide Enzyme im Zitronensäurezyklus miteinander verknüpft sind.

3.) Scharlachrot

In normalen Zellen sind die Fette im allgemeinen so fein verteilt und durch Vermittlung hydrophiler Gruppen der Lipide in der Zellstruktur so fest verankert, daß sie mit histochemischen Methoden nicht zur Darstellung gebracht werden können. Man spricht von "Maskierung der Fette". Ein Sichtbarwerden der Fettstoffe - die sogenannte Lipophanerose - erfolgt erst, wenn diese zu größeren Tropfen zusammenfließen. Das geschieht z.B. bei einer Schädigung der Zelle bei hypoxidotischer Stoffwechsellage, u.a. auch bei der Substratmangelhypoxydose (BÜCHNER). Unter diesen Bedingungen ist infolge der energetischen Insuffizienz die Synthese der Phosphatide - die einen wichtigen Bestandteil jeder Zelle darstellen - gestört, und der Phosphatidgehalt der Zelle nimmt damit ab.

Dadurch wird das Löslichkeitsvermögen der Zelle für alle Fettstoffe, vor allem für Neutralfette, die keine hydrophilen Gruppen besitzen, stark herabgesetzt, so daß sie zu mehr oder weniger großen Tropfen zusammenfließen können.

Der Zusammenhang zwischen Verfettung und Substratmangelhypoxydose scheint uns auch bei unseren Zellkulturen sehr deutlich zu sein, und zwar insofern, als in fast allen Kulturen mit zunehmendem Alter eine deutliche Zunahme scharlachrot positiver Zellen bei gleichzeitiger Abnahme der Aktivität oxydativer Fermente zu beobachten war. Außerdem war - vor allem bei den weit ausgebreiteten Zellen - sehr deutlich zu sehen, daß die SD-schwachen Zellen meist stark fettpositiv und umgekehrt die SD-starken Zellen meist fettnegativ waren.

Die beschriebenen fettpositiven Zellanhängsel und die ähnlichen isoliert liegenden Gebilde deuten wir als periphere degenerierte, verfettete und abgestoßene Zellteile.

ZWIETZ konnte in Hela-Zellen (ohne Angaben über das Alter der Zellen!) mit Scharlachrot keine Fettsubstanzen nachweisen. Möglicherweise war die von ihr angewendete Färbedauer von 2 Minuten zu kurz. FORTÉLIUS beobachtete Neutralfettropfen, jedoch ohne eindeutigen Zusammenhang mit dem Wachstumsalter. Seine Zellen wuchsen - wie schon erwähnt - unter offenbar sehr guten Bedingungen, so daß deutliche Degenerationserscheinungen nicht zu erwarten waren. Ähnliche Beobachtungen wie wir machten lediglich BIMES et al.: Am 10. Tag waren ihre Hela-Zellen mit großen Fettropfen angefüllt. Dabei war keine Doppelbrechung nachweisbar, es handelte sich also nicht um Cholesterin.

4.) Sudan Schwarz B

In fast allen Reihen, bei denen neben der Scharlachrotfärbung auch die mit Sudan B durchgeführt wurde, ergab sich, daß das Maximum der Anfärbbarkeit mit Sudan B früher auftrat als mit Scharlachrot.

Die Sudan B-Färbung stellt vor allem Phospholipide dar, und zwar auch dann, wenn diese relativ fein in der Zelle verteilt sind. Die als Strukturelemente in der Zelle vorhandenen Phospholipide werden im Verlauf einer Zellschädigung durch Lockerung der Protein-Lipoid-Komplexe zunächst der histochemischen Darstellung besser

zugänglich. Im weiteren Verlauf der Schädigung nehmen sie jedoch infolge gedrosselter Synthese wieder ab. Die in der Zelle normalerweise fein verteilten und deshalb durch die wenig empfindliche Scharlachrotmethode nicht darstellbaren Neutralfette fließen nun - wie schon unter 3.) ausgeführt - zusammen und werden erst dadurch bei der SR-Färbung sichtbar. Daß die Sudan-schwarzfärbung an späteren Tagen negative Resultate ergab, obwohl Sudanschwarz auch Neutralfette darstellen soll, ist nur so zu erklären, daß die stark gelockerten Neutralfette mit ihrer größeren Löslichkeit in Alkohol durch den Alkohol der Farblösung bei der langen Färbedauer von 3 Stunden (bei der Scharlachrotfärbung nur 15 Minuten!) aus der Zelle herausgelöst wurden. Ähnliche Beobachtungen machte ZIMMERMANN bei temporärer Ischämie an Hauptstückepithelien der Niere: Sudanschwarzpositive Substanzen traten früher auf als scharlachrotpositive.

5.) Alkalische Phosphatase (Phosphomonoesterase)

Die Phosphoesterasen spalten Phosphorsäureester in Alkohol und Phosphorsäure unter Aufnahme von Wasser. Die umgekehrte Reaktion, die Synthese von Phosphorsäureestern unter Wasserabspaltung, ist nur bei unphysiologisch hohen Substratkonzentrationen möglich (LEUTHARDT; AMMON u. DIRSCHERL). Jedoch fungieren sie auch in vivo als Phosphoryltransferasen, wobei dann ein Alkohol als Acceptor auftritt (AMMON u. DIRSCHERL). Nach PEARSE ist dies sogar die wichtigste Funktion der Phosphatasen. Eine wichtige Rolle spielen die Phosphoesterasen sowohl durch Hydrolyse als auch durch Transferierung im Stoffwechsel der Nucleotide. An der Spaltung der energiereichen Adenosinphosphate sind sie durch Spaltung des Monophosphatesters beteiligt, während Adosintri- und diphosphate durch spezifische Anhydridphosphatasen gespalten werden.

Die von uns angewandte Methode mit dem Substrat Naphthol-AS-TR-Phosphat erfaßt nach übereinstimmenden Resultaten anderer Untersuchungen (PEARSE; BURSTONE; HUNTER u. MARKERT) jedoch nur einen Teil der in der Zelle vorhandenen alkalischen Phosphatasen. Dieser Nachteil ist der Preis für die mit den Naphthol-AS-Substraten erzielte Schärfe der Lokalisation. Nach unseren und anderen Untersuchungen ist die alkalische Phosphatase ein relativ unempfindliches Ferment gegenüber äußeren schädigenden Einflüssen, so z.B.

gegenüber vorangehender Formolfixation(FORTELIUS 1963; GROPP u.HELLWEG; GROPP u.HUPE;PLENERT).Selbst völlig isolierte Zellfragmente zeigten noch eine aPh-Aktivität.Die Reaktionshemmung durch das kuppelnde Variaminblausalz ist nach PEARSE nur gering.

Unsere Beobachtungen hinsichtlich der Lokalisation des Ferments stimmen mit denen anderer Untersucher weitgehend überein:GROPP, BONTKE u.HUPE hoben vor allem die Beziehungen der alkalischen Phosphatase zur Oberfläche der Hela-Zelle und zu Oberflächenfaltungen hervor,die auch wir sehr deutlich beobachten konnten. Welche speziellen Funktionen das Ferment in den oberflächlichen Zellabschnitten zu erfüllen hat,ist bisher nicht geklärt.Analog zu der starken Aktivität dieses Enzyms in der Oberfläche von Epithelzellen des Dünndarmes,von Tubulusepithelien und Leberzellen und in der Zellmembran von Hefezellen(ZELLER),wo es mit der Aufnahme und Abgabe von Stoffen in Zusammenhang stehen soll, kann man auch bei den Hela-Zellen eine ähnliche Funktion vermuten.Eine andere Aufgabe könnte die Verankerung mit der Unterlage bzw. mit den Nachbarzellen sein.In diesem Sinne könnte die Tatsache gedeutet werden,daß Versene(das Tetranatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure)durch Komplexbindung zweiwertiger Metalle die Verankerung der Zellen löst und zu ihrer Abrundung und Ablösung führt(GROPP,BONTKE u.HUPE),und daß andererseits die Phosphatasen gerade durch zweiwertige Metalle,vor allem Magnesium,stark aktiviert bzw. durch sie erst funktionsfähig werden.Die Versene-Wirkung könnte also auf einer Hemmung der peripheren alkalischen Phosphatasen beruhen,wodurch Stoffwechsel und Funktion der Oberfläche gestört würden.Tatsächlich ist eine völlige Inaktivierung der aPh durch solche Verbindungen nachgewiesen(AMMON u.DIRSCHERL).

Die starke Aktivität in der Golgi-Zone ist bekannt(SANDRITTER u.SCHIEMER;FORTELIUS;ZWIETZ;HIRSCH),die übrige Aktivität verteilt sich auf das Cytoplasma,die Mikrosomen und in geringem Maße auf die Mitochondrien(UNDERHAY,HOLT,BEAUFAY u.DeDUVE;NOVIKOFF,PODBER,RYAN u.NOE;HIRSCH).Eine Reaktion der Kerne und Nukleolen sahen wir nicht,was mit den Angaben von PEARSE übereinstimmt Mit biochemischen Methoden ist eine geringe Aktivität der Kerne nachgewiesen,die stark positiven histochemischen Befunde mit der

Gomori-Methode sind als Artefakte anzusehen (NOVIKOFF).

Was die Aktivität der alkalischen Phosphatase in Tumorzellen im allgemeinen angeht, so sind die Ansichten sehr verschieden: DOMAGK meint, der Fermentgehalt sei meist erhöht, und zwar infolge des intensiveren Nucleinsäurestoffwechsels der Tumorzelle. Von anderen Autoren wird dagegen das sehr wechselnde Verhalten der Tumorzell-aPh hervorgehoben (BUTENANDT; AMMON u. DIRSCHERL).

Hinsichtlich des Verhaltens der alkalischen Phosphatase in alternden bzw. degenerierenden Hela-Zellen bestehen einige Widersprüche. So beschrieb FORTELIUS (1963) eine Abnahme der aPh-Aktivität vom 12. Tag an, ebenso BIMES et al. bei 12-tägiger Beobachtung (Beide Autoren benutzten eine etwas andere Methode der Fermentdarstellung als wir). Wir sahen - wie beschrieben - eine Abnahme nur in den ersten Tagen (die kleinen stark aktiven runden Zellen in den Wachstumszentren konnten wir wegen der dort zu dichten Lagerung bei der semiquantitativen Auswertung und in den graphischen Darstellungen nicht berücksichtigen). An den späteren Tagen war dann die Zunahme der Reaktionsintensität sehr deutlich zu sehen, vor allem in den Golgi-Zonen der großen Zellen.

Ob diese verstärkt erscheinende Reaktion tatsächlich auf einer echten Aktivitätszunahme des Enzyms beruht, läßt sich mit unseren Methoden nicht sicher entscheiden. Bei den kleinen geschrumpften Zellen, die auch FORTELIUS (1961) als degenerierte Zellen mit verstärkter Reaktion beschrieb, läßt sie sich mit einer Kondensierung des Cytoplasma erklären. Bei der verstärkten Reaktion in den Golgi-Zonen der großen Zellen ist diese Erklärung kaum anwendbar. Folgendes wäre hierbei noch zu diskutieren: Wenn in den alternden Zellen der gesamte Stoffwechsel nachläßt, so nimmt auch die Menge der endogenen, von der alkalischen Phosphatase spaltbaren Substrate ab. Diese stehen bei der histochemischen Reaktion in Konkurrenz mit dem zugesetzten Substrat Naphthol-AS-TR-Phosphat. Nehmen die endogenen Substrate ab, so kann das exogene Substrat in verstärktem Maße gespalten werden. Daß dieser Effekt nur bei der alkalischen Phosphatase sichtbar wird, mag mit der relativen Unempfindlichkeit dieses Ferments gegenüber Schädigungen zusammenhängen. Allerdings ist mit biochemischen Methoden auch eine echte Zunahme der Aktivität der alkalischen Phosphatasen bei stationären Zellen in Deck-

glaskulturen nachgewiesen worden, wenn auch nicht bei Hela-Zellen (NITOWSKY u. HERZ). Dazu ist des weiteren zu bedenken, daß die größeren Zellen mit ausgeprägter Golgi-Zone meist mehrkernig sind und trotzdem nur eine zusammenhängende, kaum größere Golgi-Zone besitzen; ihre größere Aktivität könnte sich durch den insgesamt vermehrten DNS-Bestand (Mehrkernigkeit) und damit erhöhten Stoffwechsel erklären.

Zusammengefaßt möchten wir das Verhalten der alkalischen Phosphatase folgendermaßen deuten: Die jungen Zellen der Wachstumszentren besitzen eine starke aPh-Aktivität. Diese nimmt zunächst beim Anwachsen (Umwandlung in spindelige und polygonale Formen) und Größerwerden der Zellen etwas ab, z. T. sicher nur scheinbar, nämlich bedingt durch das Flacherwerden der Zellen beim Ausbreiten auf der Glasoberfläche. Dann aber wird die Aktivität zunehmend stärker, und zwar im Zusammenhang mit dem Wachstum der Zellen. Von einem bestimmten Zeitpunkt an setzt die Alterung von der Peripherie her ein, wobei das Zellzentrum zunächst noch stark aktiv bleibt. Ist der periphere Saum degeneriert, so kann sich das Zellzentrum abrunden und ablösen und als kleine runde Zelle erscheinen. Die starke aPh-Aktivität in diesem späten Stadium ist sicher vorwiegend nur eine scheinbare, nämlich durch Kondensierung und Schrumpfung des Cytoplasmas.

6.) Saure Phosphatase (Phosphomonoesterase)

Über die genauen Funktionen dieses Ferments bzw. Fermentkomplexes innerhalb des Zellstoffwechsels ist ebenso wie bei der alkalischen Phosphatase wenig bekannt.

Im übrigen gilt hinsichtlich der Funktionen, der Methodik usw. im wesentlichen das bei Besprechung der alkalischen Phosphatase Gesagte.

Die Beobachtungen hinsichtlich der Lokalisation entsprechen denen anderer Untersucher: Die diffuse bis wolkige Färbung im Cytoplasma entspricht dem Nachweis des Ferments im Überstand bei der fraktionierten Zentrifugierung (DeDUVE u. BERTHET; NOVIKOFF, PODBER, RYAN u. NOE; ZEIGER). Die stark positive paranukleäre Zone wird von den meisten Autoren ebenso wie bei der alkalischen Phosphatase mit der Golgi-Zone gleichgesetzt (FÖRTELIUS; GREEN u. VERNEY; NOVIKOFF u. GOLDFISCHER; SANDRITTER u. SCHIEMER; ZWIETZ).

Über die Natur der sPh-positiven Granula bestehen bei den verschiedenen Verfassern noch unterschiedliche Ansichten. Es handelt sich dabei entweder um Mitochondrien oder größere Mikrosomen. NOVIKOFF, PODBER u. RYAN glaubten 1950 noch, daß die saure Phosphatase vor allem in den Mitochondrien lokalisiert sei, in späteren Untersuchungen (NOVIKOFF, PODBER, RYAN u. NOE 1953) wiesen sie jedoch nach, daß sich bei vorsichtiger fraktionierter Zentrifugierung von der schwach aktiven Mitochondrienfraktion eine viel stärker aktive Fraktion großer Mikrosomen abtrennen ließ. Diese Mikrosomen sollen noch andere saure Hydrolasen enthalten und werden auch als Lysosomen bezeichnet (DeDUVE, UNDERHAY et al.). Daß die Kerne wenig Ferment, nämlich nur 5% der gesamten sauren Phosphatase der Zelle enthalten, ist von PALADE biochemisch nachgewiesen worden. Die starke Positivität der Kerne bei der Gomori-Methode ist wie bei der alkalischen Phosphatase artefiziell bedingt.

Die Abnahme der sPh-Aktivität der Hela-Zellen mit zunehmendem Alter kam in allen Reihen zum Ausdruck, und zwar desto schneller und stärker, je dichter die Zellen lagen. Der Abfall erfolgte nur um wenig langsamer und später als der der Succinodehydrogenase, des empfindlichsten Enzyms. Eine Abnahme der Aktivität bei Hela-Zellen beschreibt auch FORTELIUS. GREEN u. VERNEY wiesen die saure Phosphatase bei einer sehr zellarmen Kultur (10 000 Zellen pro ml Nährlösung) noch nach 9-12 Tagen nach, allerdings ohne Vergleich mit den ersten Tagen.

Bemerkenswert scheint uns der auffällige Unterschied im Verhalten der beiden Phosphatasen zu sein, nämlich die starke Empfindlichkeit und Aktivitätsminderung der sauren Phosphatase im Gegensatz zur Resistenz und sogar Reaktionszunahme der alkalischen Phosphatase.

7.) Amino-peptidase (sogenannte Leucinamino-peptidase)

Nach PEARSE hydrolysiert das als "Leucinamino-peptidase" bekannte Ferment eine Anzahl von Peptiden, die eine freie α -Amino-gruppe an einem endständigen Leucin- oder ähnlichen Rest tragen. Von ACKERMAN wurde sogar nachgewiesen, daß Alaninyl- β -Naphthylamid noch schneller gespalten wird als das analoge Leucylsalz. Andererseits ergaben Versuche von SYLVEN u. BOIS, daß das Substrat L-Leucyl-

- β -Naphthylamid nicht nur von der rein dargestellten sogenannten "Leucinaminopeptidase", sondern auch von χ -Chymotrypsin, von Prolinase und von einem weiteren Enzym gespalten wird. Von den meisten Autoren wird wegen dieser offensichtlichen Unspezifität dieses Ferments der Begriff "Leucinaminopeptidase" durch den allgemeineren Ausdruck "Aminopeptidase" ersetzt (NACHLAS, GOFSTEIN u. SELIGMAN; FORTÉLIUS). SYLVÉN u. BOIS sprechen sogar wegen der Mehrzahl der beteiligten Fermente noch allgemeiner nur von der "Burstone-Folk-naphthylamide reaction".

Die Aminopeptidase wurde an Hela-Zellen histochemisch bisher nur von FORTÉLIUS und ZWIETZ nachgewiesen. Wir übernahmen die von ZWIETZ benutzte Methode mit L-Leucyl- β -Naphthylamid als Substrat und Fast Garnet GBC-Salz als kuppelndes Diazoniumsalz. Die Ergebnisse mit dieser Methode waren nicht sehr befriedigend, da die Reaktion nur schlecht und unscharf lokalisiert war. Jedoch war - was auch ZWIETZ und FORTÉLIUS beobachteten - die betonte Reaktion im Bereich der Golgi-Zone deutlich, besonders bei den ausgebreiteten Zellen der Deckglaskulturen mit geringerer Zelldichte.

An alternden Hela-Zellen ist das Ferment unseres Wissens bisher noch nicht untersucht worden. Unsere Beobachtungen in dieser Hinsicht gehen dahin, daß die Aminopeptidase relativ unempfindlich ist, da eine deutliche Verminderung der Reaktionsstärke erst sichtbar wurde, wenn die anderen Enzyme schon weitgehend inaktiv waren. Einen vollständigen Verlust der AP-Aktivität sahen wir überhaupt nicht. Die ältesten Zellen zeigten nur noch einzelne positive unregelmäßige Granula, die diffuse Untergrundfärbung der jüngeren Zellen war verschwunden. Einen ähnlichen Befund sahen wir ja auch bei der sauren Phosphatase, bei der ebenfalls die diffuse Färbung eher verschwand als die der Granula. In diesem Zusammenhang erscheint es uns interessant, daß DeDUVE u. BERTHET eine besondere Art von Zellgranula beschreiben, die drei Arten löslicher Hydro-lasen enthalten und deren Membran für die entsprechenden Substrate undurchlässig sein sollen. Die Verfasser schließen daraus und aus der granulären Lokalisation der hydrolytischen Enzyme überhaupt, daß dies ein Mittel sein könnte, um die Aktivität der Hydro-lasen in Schranken zu halten, da sie bei freier Verteilung und unbeschränkter Aktivität den Zellstoffwechsel stören würden.

Die eigentlich aktiven hydrolytischen Fermente wären demnach nur die diffus im Cytoplasma verteilten, während die der Granula sozusagen in Reserve stehen. Vielleicht sind die letzteren auch deshalb etwas beständiger.

8.) PAS-Reaktion

Die PAS-Reaktion hob wie viele der anderen Reaktionen die paranukleäre Golgi-Zone hervor. Dieser Befund wurde auch von ZWIETZ erhoben. Sie fand ebenso wie wir, daß es sich dabei nicht um Glykogen handelt, und sicherte diesen Befund außerdem durch den negativen Ausfall der Best'schen Carminfärbung.

Ein Herauslösen des Glykogens durch das Formol ist bei unserer kurzen Fixierungszeit von nur 20 Minuten auszuschließen.

GROPP, BONTKE u. HUPE beschreiben eine positive PAS-Reaktion, kontrollierten diese aber nicht durch die Diastase-Probe, so daß sich über den Glykogengehalt ihrer Hela-Zellen nichts aussagen läßt. Demgegenüber sahen BIMES et al. Glykogen im Cytoplasma und in den Nukleolen ihrer Hela-Zellen. Sie beschrieben auch eine Abnahme des Glykogengehaltes mit zunehmendem Alter.

Diese Unterschiede können auf Verwendung verschiedener Hela-Unterstämmen beruhen, wahrscheinlicher aber noch auf Verschiedenheiten in der Zusammensetzung des Nährmediums. Die Annahme, daß der Glykogengehalt der Zellen in starkem Maße von äußeren Bedingungen abhängt, legen die Ergebnisse von FASSKE nahe, der bei der histochemischen Untersuchung von in vivo gewachsenen 100 verschiedenen menschlichen Tumoren, darunter 45 Carcinomen, einen stark wechselnden Glykogengehalt fand. Diese Unterschiede waren nicht so sehr von der Art des Tumors als vielmehr vom Standort der einzelnen Tumorzelle abhängig, d.h. vor allem von ihrer Beziehung zum ernährenden Stroma: Stromanahe Zellen enthielten wenig, stromaferne viel Glykogen. Die stromanahen, glykogenfreien Zellen zeigten eine wesentlich stärkere Aktivität der oxydativen Enzyme des Zitronensäurezyklus als die stromafernen, in denen die Fermente der Glykolyse überwogen. FASSKE folgert daraus, daß die glykogenfreien Krebszellen die Glukose oxydativ, die stromafernen glykogenhaltigen dagegen glykolytisch umsetzen. Diese Ergebnisse rechtfertigen u.a. auch die von uns angenommene zentrale Bedeutung der oxydativen Enzyme für den Stoffwechsel unserer glykogenfreien Hela-Zellen.

Die von uns gemachten Beobachtungen hinsichtlich einer Abnahme der PAS-Färbbarkeit erlauben keine weitreichenden Schlüsse, da diese Abnahme erst in sehr weit fortgeschrittenen Stadien auftrat. Da es sich jedoch bei unseren Zellen offensichtlich nicht um Glykogen handelt, kommen als reagierende Substanzen Glykoproteide und evtl. bestimmte Lipide (Glykolipide) in Frage, Substanzen, die fest in der Zellstruktur verankert sind und deswegen auch keinen großen Veränderungen unterworfen sein können. Der Gehalt an Glykogen als eines Vorratsstoffes könnte - wie bei BIMES et al. - wesentlich stärker schwanken.

9.) Morphologie

Die Suspensionszellen ließen den Charakter einer malignen epithelialen Geschwulst weniger deutlich erkennen als die stationären Zellen. Erstere zeigten aber doch eine starke Polymorphie der Kerne und eine Mehrzahl sehr polymorpher Nukleolen, beides typische Zeichen einer malignen Geschwulst. Der Epithelcharakter der Zellen drückte sich darin aus, daß sie die Neigung besaßen, sich dicht und lückenlos aneinanderzuschließen, wodurch dichte Zellkonglomerate entstanden, die z.T. trotz der Trypsinierung noch zusammenhielten. Die Zellgrenzen der Einzelzellen waren meist unscharf, vermutlich durch den Angriff des Trypsins. Die zarten Ausläufer, Fortsätze und blasenartigen Ausstülpungen sprechen vielleicht für die Tendenz der Zelle zur peripheren Ausbreitung, die durch Fehlen der Haftfläche und durch die ständige Bewegung (durch das Rührwerk) nicht zur Entfaltung kommen konnte. Die Mitosen schienen normal abzulaufen, jedenfalls waren mehrkernige Zellen nicht vorhanden.

Die frisch in die Petrischalen eingebrachten Zellen waren zunächst auch rund. GROPP, BONTKE u. HUPE beschrieben dazu ausführlich, wie bei der Trypsinierung der stationären Zellen (der Elternkultur) die zentralen Cytoplasmaabschnitte aus der Zelle herausgelöst bzw. die peripheren Teile abgedaut werden. Die dabei entstehenden Defekte werden offensichtlich sofort geschlossen, indem das Cytoplasma der Zellperipherie in den Gelzustand übergeht. Jedenfalls bedeutet der Verlust der peripheren Cytoplasmateile keine übermäßige Beeinträchtigung der Zelle, denn sie kann unter geeigneten Bedingungen sich wieder auf der neuen Glasoberfläche vergrößern und ausbreiten.

Geeignete Bedingungen bedeutet vor allem auch ausreichende Nährstoffe. Nur wenn die Zellen nicht zu dicht lagen (50 000-150 000 Zellen pro ml bei der Auspflanzung), breiteten sie sich auf der Glasoberfläche aus und wurden größer. Bei sehr dichter Lagerung (220 000 Zellen pro ml) blieben sie klein und rund und wuchsen also auf der Glasoberfläche nicht an.

Die stationären Zellen zeigten ihren malignen Charakter sehr deutlich durch Ausbildung bizarrer und oft riesiger Zelleiber. Die Mehrkernigkeit und das Auftreten sehr großer Kerne sprechen für die Störung der normalen Mitosen. Vielleicht verhindert das Haften an der Glasoberfläche durch die Unmöglichkeit bzw. Erschwerung der Massenverschiebung die regelrechte Teilung des Zelleibes. Bei den Suspensionszellen sahen wir ja keine mehrkernigen Zellen, und ebenso wurden auch von den haftenden Zellen an ihren freien Oberflächen zahlreiche kleine runde einkernige Zellen in das freie Nährmedium abgeteilt, was in den Wachstumszentren besonders deutlich zu sehen war.

Bei allen, auch den besten Kulturen, nahm die Gesamtzahl der Zellen nach einigen Tagen wieder ab, da sich offensichtlich die schwächeren Zellen wieder von der Glasoberfläche lösten und in das Nährmedium abschwammen. Dieser Ablösevorgang scheint durch Degeneration der Zellperipherie bedingt, er entspricht morphologisch der von GROPP, BONTKE u. HUPE beschriebenen Ablösung durch Trypsin, bei der ebenfalls die peripheren Zellabschnitte zerstört werden.

E. Zusammenfassung

Alle ausgeführten histochemischen Reaktionen, mit Ausnahme der alkalischen Phosphatase, veränderten sich im Laufe des Wachstums der stationären Hela-Zellen im Sinne einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels, also Alterung bzw. Degeneration:

Deutliche Aktivitätsabnahme der oxydativen Enzyme und der sauren Phosphatase bei gleichzeitiger Zunahme intrazellulär nachweisbarer Fettstoffe, weniger deutlicher Intensitätsabfall der Amino-peptidase- und PAS-Reaktion.

Die Deutungsmöglichkeiten für die Intensitätszunahme der alkalischen Phosphatase-Reaktion wurden diskutiert.

Die Alters-bzw. degenerativen Veränderungen traten desto schneller und früher in Erscheinung, je größer die Zelldichte bei der Auspflanzung war: Bei hohen Zellkonzentrationen (200 000 und mehr Zellen pro ml) schon vom 1. Tag an, bei geringer Zelldichte (50 000 Zellen pro ml) erst nach etwa einer Woche.

Die Ursache der Alterungs- und Degenerationerscheinungen sehen wir wegen ihrer deutlichen Abhängigkeit von der Zelldichte in erster Linie im Verbrauch des Nährmediums.

Bei den unter optimalen Ernährungsbedingungen gezüchteten Suspensionszellen ließen sich histochemisch keine wesentlichen Unterschiede zu frisch ausgepflanzten stationären Zellen feststellen.

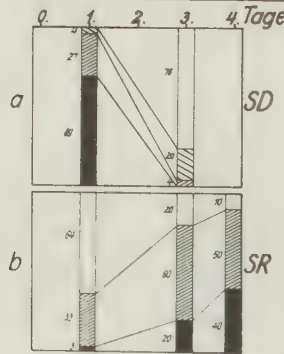
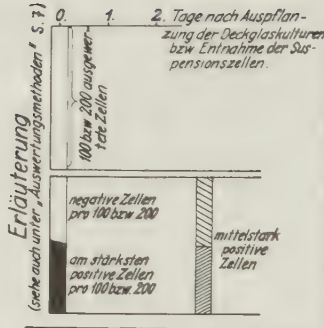


Abb1 Deckglaskultur mit sehr hoher Zelldichte (220000 Zellen pro ml bei der Auspflanzung). Beobachtung 4 Tage

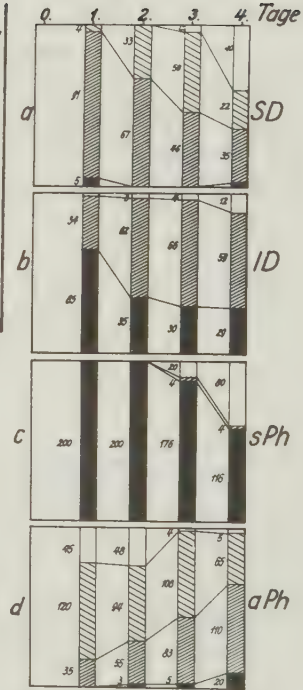


Abb.2: Deckglaskultur mit hoher Zelldichte (200000 pro ml bei der Auspflanzg.) Beobachtung 4 Tage.

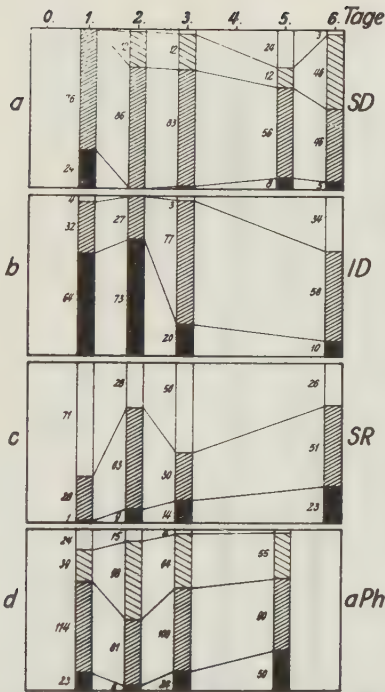
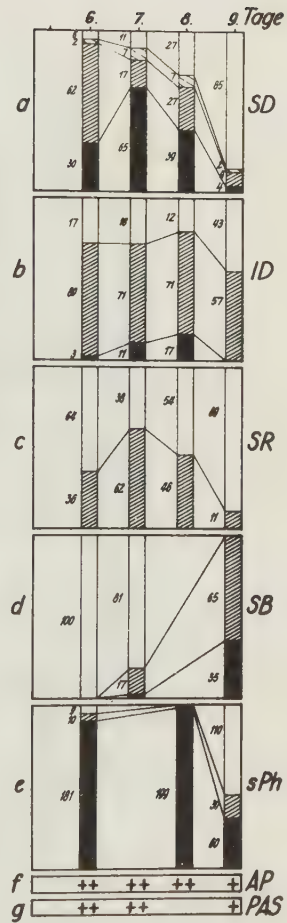
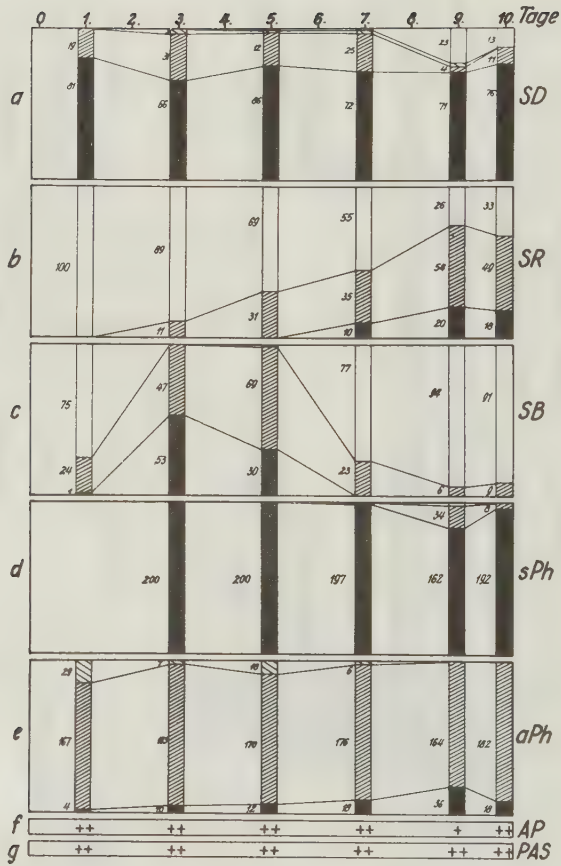


Abb. 3(links) u. Abb. 4(rechts): Deckglaskultur mit mittelhoher Zelldichte (150 000 Zellen pro ml bei der Auspflanzung). Beobachtung 6 bzw. 9 Tage.



f ++ ++ ++ + AP
g ++ ++ + PAS



Legende auf der nächsten Seite

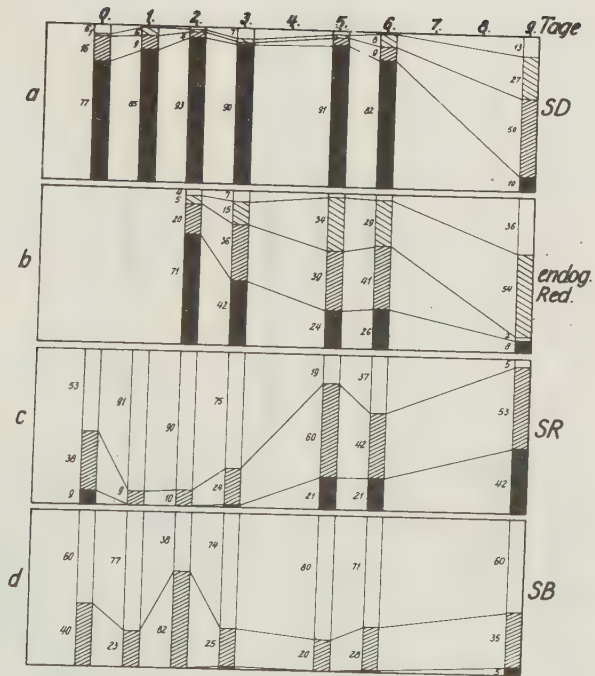


Abb. 6: Suspensionszellsediment bei 4°C.
Beobachtung 9 Tage

Abb. 5 (nebenstehende Seite): Deckglaskultur mit
geringer Zelldichte (50 000 Zellen pro ml bei
der Aussaat). Beobachtung 10 Tage.

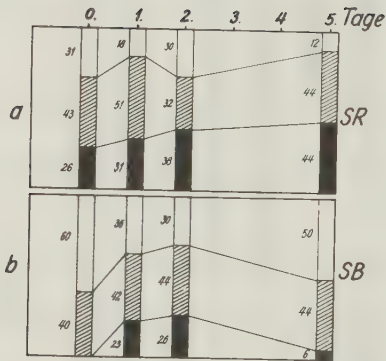


Abb. 7: Suspensionszellsediment bei 4°C
Beobachtung 5 Tage.

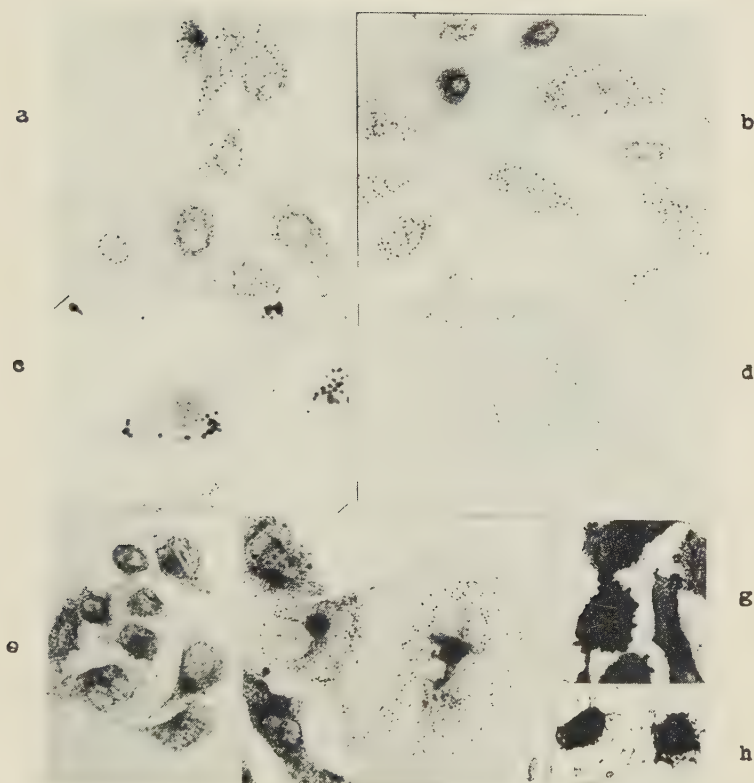


Abb.8:Deckglaskultur mit geringer Zelldichte
(50 000 Zellen pro ml bei d.Auspflanzung)

a:	Succinodehydrog.	3	Tg.nach	Auspflanzg	;1:420
b:	"	10	"	"	1:420
c:	Sudanschwarz	5	"	"	1:670
d:	Scharlachrot	9	"	"	1:420
e:	Alk.Phosphatase	1	"	"	1:420
f,g,h:	"	10	"	"	1:420

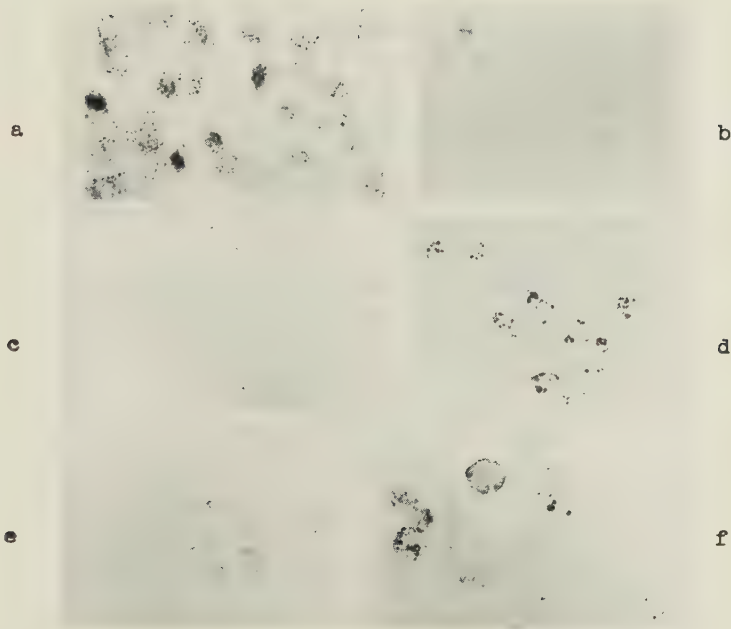


Abb.10:a-d Deckglaskultur mit sehr hoher Zelldichte(220 000 Zellen pro ml bei d.Auspflanzung)
a:Succinohydrog. 1 Tg.nach Auspflanzg.,1:420
b: " " 3 Tg.nach Auspflanzg.,1:420
c:Scharlachrot 1 Tg.nach Auspflanzg.,1:420
d: " " 3 Tg.nach Auspflanzg.,1:420
e: " " Suspensionszellsediment
frisch entnommen 1:420
f: " " Suspensionszellsediment
9 Tage nach Entnahme 1:420

G. Literaturverzeichnis

1. Ackerman, G.A.: Histochemical demonstration of aminopeptidase activity in the leucocytes of blood and bone marrow. J.Histochem.Cytochem. 8, 386 (1960).
2. Altmann, H.W.: Allgemeine morphologische Pathologie des Cytoplasmas. Handbuch der allgemeinen Pathologie, 2. Band, 1. Teil. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1955.
3. Ammon, R. und Dirscherl, W.: Fermente, Hormone, Vitamine. Band I. Stuttgart: Georg Thieme-Verlag 1959.
4. Antopol, W., Fried, G.H. und Kodza, H.: Studies on metabolism of fibroblast cells in tissue culture utilizing neotetrazolium. Trans.N.Y.Acad.Sci. 17, 385-388 (1955).
5. Barban, S. und Schulze, H.O.: Metabolism of tissue culture cells. The presence in Hela cells of the enzymes of the citric acid cycle. J.Biol.Chem. 222, 665-670 (1956).
6. Barrnet, R.J.: The demonstration with the electron microscope of the endproducts of histochemical reactions in relation to the fine structure of cells. Exp.Cell Res., Suppl. 7, 65-89 (1959).
7. Beneke, G. und David, H.: Vergleichende histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur intravitalen Reduktion von Tetrazoliumverbindungen. Acta histochem. 13, 179-193 (1962).
8. Beneke, G. und Simon, H.: Über das Auftreten von Halb-bzw. Mono-reduktionsstufen bei Verwendung von Ditetrazoliumsalzen für den histotopochemischen Dehydrogenasen-Nachweis. Naturwissenschaften 48, 74-75 (1961).
9. Bimes, C., Planel, H. und David, J.F.: Reserches histochimiques sur la souche cancreuse Hela. Compt.rend.Soc.biol. Paris 153, 347-350 (1959).
10. Black, M.M.: Quantitative and histochemical usage of triphenyl-tetrazolium in pathology. Trans.N.Y.Acad.Sci. 17, 398-401 (1955).
11. Büchner, F.: Die Pathologie der cellulären und geweblichen Oxydationen. Handbuch der allgemeinen Pathologie, 4. Band, 2. Teil, Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1957.

12. Burlington, H.: Enzyme patterns in cultured kidney cells. Amer. J. Physiol. 197, 68-70 (1959).
13. Burstone, M. S.: Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates. J. Nat. Cancer Inst. 21, 523-540 (1958).
14. Burstone, M. S. und Folk, J. E.: Histochemical demonstration of aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. 4, 217-226 (1956).
14. Burtner, H. J., Bahn, R. C. und Longley, J. B.: Observations on the reduction of tetrazolium salts in biological systems. J. Histochem. Cytochem. 4, 438-429 (1956).
16. Butenandt, A. und Dannenberg, H.: Die Biochemie der Geschwülste. Handbuch der allgemeinen Pathologie, 6. Band, 3. Teil. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1956.
17. Domagk, G.: Die experimentelle Geschwulstforschung. Handbuch der allgemeinen Pathologie, 6. Band, 3. Teil. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1956.
18. van Duijn, C.: Bauer-Schiff and periodic acid-Schiff polysaccharose reactions in some normal and malignant cell types. Mikroskopie 10, 75-82 (1955).
19. de Duve, C.: Intracellular localisation of enzymes. Nature 187, 836 und 853 (1960).
20. de Duve, C. und Berthet, J.: The use of differential centrifugation in the study of tissue enzymes. Int. Rev. Cytol. 3, 225-275 (1954).
21. Farber, E., Sternberg, W. H. und Dunlap, C. E.: Histochemical localisation of specific oxidative enzymes. III. Evaluation studies of tetrazolium staining method for diphosphopyridine nucleotide diaphorase, triphosphopyridine nucleotide diaphorase and the succinic dehydrogenase system. J. Histochem. Cytochem. 4, 284-294 (1956).
22. Fasske, E.: Histotopochemische Enzymmuster menschlicher Carcinome. Verh. dtsch. Ges. Path., 46. Tagung, 359-365 (1962).
23. Fortelius, P.: Enzyme activity in cultured cells under various influences. Acta path. microbiol. Scand., Suppl. 164 (1963).

24. Fortelius, P., Levonen, E. und Saxen, E.: Cytochemical demonstration of some enzyme systems in Hela cells. *Acta path. microbiol. Scand.* 52, 23-33 (1961).
25. Fortelius, P., Saksela, E. und Saxen, E.: A Hela cell clonal line lacking alkaline phosphatase activity. *Exp. Cell Res.* 21, 616-618 (1960).
26. Gey, G.O., Coffman, W.D. und Cubicek, M.T.: Tissue culture studies of the proliferate capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-265 (1952).
27. Gössner, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. *Histochemie* 1, 48-96 (1958/59).
28. Green, M.H. und Verney, E.L.: A simple method for the study of intracellular acid phosphatase in Hela cells. *J. Histochem. Cytochem.* 4, 106-109 (1956).
29. Gropp, A.: Vergleichende enzymhistochemische Beobachtungen zum Phosphatasenachweis an einigen Carcinomzellstämmen in vitro sowie über milieubedingte Veränderungen der Enzymaktivität. *Zschr. Krebsforsch.* 63, 156-167 (1959).
30. Gropp, A., Bontke, E. und Hupe, K.: Untersuchungen zum Nachweis der alkalischen Phosphatase an in vitro gezüchteten menschlichen Carcinomzellen mit besonderer Berücksichtigung ihrer Beziehung zu der Zelloberfläche. *Exp. Cell Res.* 15, 200-213 (1958).
31. Gropp, A. und Hellweg, H.R.: Cytologische und encymcytochemische Untersuchungen über die Zelloberfläche an in vitro gezüchteten Zellen. *Zschr. Zellforsch.* 50, 315-331 (1959).
32. Gropp, A., Hellweg, H.R. und Hupe, K.: Zum Nachweis der Adenosintriphosphatase (ATPase) an in vitro gezüchteten Carcinomzellen. *Naturwissenschaften* 45, 394 (1958).
33. Gropp, A. und Hupe, K.: Fermenthistochemische Reaktionen an lebenden Zellen in Gewebekulturen. *Klin. Wschr.* 36, 361-362 (1958).
34. Hartmann, F. und Fleck, U.: Vergleichende chemische und histologische Analyse der Leberverfettung. *Klin. Wschr.* 30, 652-654 (1952).

35. Hartmann, F., Ruwe, F. und Schulze, G.: Der Lipoidstoffwechsel des tetrachlorkohlenstoffvergifteten Hundes unter der Wirkung von Methionin, Inositol und Invertzucker, Arch. exper. Path. u. Pharmak. 217, 98-106 (1953).
34. Hirsch, G. C.: Allgemeine Stoffwechsellmorphologie des Cytoplasmas. Handbuch der allgemeinen Pathologie, 2. Band, 1. Teil. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1955.
37. Hunter, R. L. und Markert, C. L.: Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science 125, 1294-1295 (1957).
38. Iversen, O. H.: Estimation of the endogenous activity of epidermal cells of hairless mice using the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride. Acta path. microbiol. Scand. 47, 216-224 (1959).
39. Kahn, R. H., Conklin, J. L. und Dewey, M. M.: Cytological and cytochemical characterisation of cells grown in vitro. J. Nat. Cancer Inst., Monogr. 7, 123-146 (1962).
40. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart: Georg Thieme-Verlag 1962.
41. Kaufman, N. und Hill, R.: Determination of succinic dehydrogenase activity in tissue culture. J. Histochem. Cytochem. 7, 144-146 (1959).
42. Kivy-Rosenberg, E., Cascarano, J. und Zweifach, B. W.: Tetrazolium salts as indicators of change in tissue metabolism during functional activity. Trans. N. Y. Acad. Sci. 17, 402-406 (1955).
43. Konrad, D.: Inauguraldissertation, Frankfurt/Main 1964, in Arbeit.
44. Krey, H.: Inauguraldissertation, Frankfurt/Main 1964, in Arbeit.
45. Leitloff, T. B.: Über den quantitativen histochemischen Nachweis von Diaphorasen und Dehydrogenasen und ihre intravitale Blockierung durch elektive Inhibitoren. Frankfurt/Main: Inauguraldissertation 1961.

46. Leuthardt, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie. Berlin: Walter de Gruyter u. Co. 1959.
47. Lieberman, I. und Ove, P.: Enzyme activity levels in mammalian cell cultures. J. Biol. Chem. 233, 634-636 (1958).
48. Lipp, W.: Histochemische Methoden. München: R. Oldenbourg-Verlag, Heft I (1954)
Heft XVI (1958)
49. May, G.: Zur Verwendung von Caseinhydrolysat als Nährmedium für Gewebekulturen. Zbl. Bakt., Abt. I, Orig. 175, 481-484 (1959).
50. May, G.: Die Kultivierung von Säugetierzellen in Suspensionskultur. Frankfurt/Main: Habilitationsschrift 1962.
51. Nachlas, M. M., Goldstein, T. P. und Seligman, A. M.: An evaluation of aminopeptidase specificity with seven chromogenic substrates. Arch. Biochem., New York 97, 223-231 (1962).
52. Nachlas, M. M., Tsou, K. C., de Souza, E., Cheng, C. S., Seligman, A. M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem. 5, 420-436 (1957).
53. Nachlas, M., Walker, D. G. und Seligman, A. M.: The histochemical localisation of TPN-diaphorase. J. biophys. biochem. Cytol. 4, 467-474 (1958).
54. Nitowsky, H. M. und Herz, F.: Alkaline phosphatases in cell cultures of human origin. Nature 189, 756-757 (1961).
55. Novikoff, A. B.: The validity of histochemical phosphatase methods on the intracellular level. Science 113, 320-325 (1951).
56. Novikoff, A. B. und Goldfischer, S.: Nucleosidediphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 802-810 (1961).
57. Novikoff, A. B., Podber, E. und Ryan, J.: Intracellular distribution of phosphatase activity in rat liver. Federation Proc. 9, 210 (1950).
58. Novikoff, A. B., Podber, E., Ryan, J. und Noe, E.: Biochemical heterogeneity of the cytoplasmic particles isolated from rat liver homogenates. J. Histochem. Cytochem. 1, 27-46 (1953).

59. Palade, G.E.: Intracellular localisation of acid phosphatase, a comparative study of biochemical and histochemical methods. *J. Exper. Med.* 94, 535-548 (1951).
60. Pearse, A.G.E.: Histochemistry, theoretical and applied. London: 2nd ed. Churchill, 1960.
61. Pearse, A.G.E., Scarpelli, D.G. und Hess, R.: A cytochemical study of the dehydrogenases of mitochondria and mitochondrial particulates by a monotetrazolium cobalt chelation method. *J. biophys. biochem. Cytol.* 7, 243-249 (1960).
62. Plaut, G.W.E. und Sung, S.C.: Diphosphopyridine nucleotide isocitric dehydrogenase from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 207, 305-314 (1954).
63. Plenert, W.: Der histochemische Nachweis der alkalischen Phosphatase als Routinemethode. *Acta histochem.* 5, 79-88 (1957).
64. Rutenberg, A.M., Gofstein, R. und Seligman, A.M.: Preparation of a new tetrazolium salt which yields a blue pigment on reduction and its use in the demonstration of enzymes in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 10, 113-121 (1950).
65. Sandritter, W. und Schiemer, H.-G.: Histochemische Untersuchungen an Hela-Zellen. *Verh. dtsh. Ges. Path.*, 42. Tagung, 449-458 (1958).
66. Scarpelli, D.G.: Intracellular localisation of succinic dehydrogenase and DPNH cytochrome c reductase as revealed by electron microscopy. *Ann. Histochem.* 6, 279-282 (1961).
67. Schreiber, G. und Simon, H.: Beitrag zur Technik des histochemischen Dehydrogenasenachweises. *Acta histochem.* 15, 192-193 (1963).
68. Seligman, A.M. und Rutenberg, A.M.: Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science* 113, 317-320 (1951).
69. Sylven, B. und Bois, I.: Studies on the histochemical "leucine aminopeptidase" reaction. I. Identity of the enzymes possibly involved. *Histochemie* 1, 65-78 (1962).
70. Turner, G.S.: Succinic dehydrogenase in short-term cultures of normal cells. *Nature* 193, 164 (1962).
71. Underhay, E., Holt, S.J., Beaufay, H. und de Duve, C.: Intracellular localisation of esterase in rat liver. *J. biophys. biochem. Cytol.* 2, 635-637 (1956).

72. Verne, J. und Wegmann, R.: Considération sur la réduction des sels de tetrazolium (une revue). *Ann. Histochem.* 1, 199-212 (1955).
73. Wachstein, M.: Histochemistry of enzymes in tumors. *Handbuch der Histochemie*, Band VII, 2. Teil. Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag 1962.
74. Weinreb, E. L.: Histochemical demonstration of sites of acid phosphatase activity in mitochondria. *Exp. Cell Res.* 8, 159-162 (1955).
75. Young, M. R. und Edwards, R. G.: Ultraviolet microscopy and the detection of formazan deposits. *J. Histochem. Cytochem.* 2, 444-446 (1963).
76. Zeiger, K.: Morphologie des Cytoplasmas. *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, 2. Band, 1. Teil. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1955.
77. Zeller, E. A.: Allgemeine Physiologie und Pathologie der Enzyme. *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, 2. Band, 1. Teil. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1955.
78. Zimmermann, H.: Experimentelle Untersuchungen über funktionelle, morphologische und histochemische Veränderungen im Gefolge zeitlicher Durchblutungsstörungen. Gießen: Habilitationsschrift 1957.
79. Zimmermann, H. und Platt, D.: Experimentelle vergleichende Untersuchungen über qualitative und quantitative histochemische Darstellung von Dehydrogenasen und Diaphorasen. *Histochemie* 2, 125-135 (1960).
80. Zwietz, E.: Qualitative histochemische Untersuchungen an Hela-Zellen, unter besonderer Berücksichtigung der Mitosen. Frankfurt/Main: Inauguraldissertation 1959.

Lebenslauf

Am 28. April 1936 wurde ich als zweites Kind des Arztes Prof.

Dr. Werner Hollmann und seiner Ehefrau Dr. Margarete, geb. Zimmermann, in Wiesbaden geboren.

Von 1942 bis 1951 besuchte ich Volks- bzw. Grundschulen in Brandenburg/Havel, Osterrönfeld in Holstein, im Landschulheim Hamborn bei Paderborn und in Potsdam.

Ich verließ 1951 die Schule, um bis 1954 an Konservatorien und Hochschulen in Cottbus und Ost-Berlin Musik zu studieren. Jedoch brach ich das Musikstudium dann ab und bereitete mich auf die Reifeprüfung als Nichtschüler vor, welche ich im Herbst 1956 in West-Berlin bestand.

Im Sommersemester 1957 begann ich an der Freien Universität in West-Berlin das Medizinstudium. Dort legte ich im Herbst 1959 die ärztliche Vorprüfung ab. Das medizinische Staatsexamen bestand ich am 22. Dezember 1962 in Würzburg.

Am 1. Februar 1963 trat ich eine Medizinalpraktikantenstelle am Senckenbergischen Pathologischen Institut in Frankfurt/Main an. Hier führte ich die vorgelegte Dissertationsarbeit aus.

Matthias Hollmann

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main eingereichte Arbeit mit dem Titel "Histochemische und morphologische Beobachtungen bei der Alterung von Hela-Zellen" im Senckenbergischen Pathologischen Institut in Frankfurt/Main unter Leitung von Prof. Dr. H. Zimmermann mit Unterstützung durch Prof. Dr. K. Herzberg und Priv.-Doz. Dr. G. May vom Hygiene-Institut der Universität Frankfurt/Main ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wird in der "Frankfurter Zeitschrift für Pathologie" (in geänderter bzw. erweiterter Form) veröffentlicht.

Metties Holmann

Meine akademischen Lehrer waren:
Prof. Fischer, Prof. Schütte, Prof. v. Herrath
Prof. Freiherr v. Kreß, Prof. Linder, Prof. Schwalm
Prof. Loeschke, Prof. Gasteiger, Prof. Wullstein,
Prof. Witt, Prof. Sonnenschein, Prof. Scheller,
Prof. Schaltenbrand, Prof. Maßhoff, Prof. Krauland.

